

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005480

International filing date: 25 March 2005 (25.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-124524
Filing date: 20 April 2004 (20.04.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 4 月 2 0 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 2 4 5 2 4

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 1 2 4 5 2 4

出 願 人
Applicant(s): 株式会社日本触媒

2 0 0 5 年 4 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P04-0356
【提出日】 平成16年 4月20日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1－2 5－1 2 株式会社日本触媒内
 【氏名】 安田 信三
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1－2 5－1 2 株式会社日本触媒内
 【氏名】 向山 正治
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1－2 5－1 2 株式会社日本触媒内
 【氏名】 堀川 洋
【発明者】
 【住所又は居所】 岡山県岡山市宿本町 8－5 0
 【氏名】 虎谷 哲夫
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市共和 1－3－3 3－6 0 4
 【氏名】 森田 英利
【特許出願人】
 【識別番号】 0000004628
 【氏名又は名称】 株式会社 日本触媒
【代理人】
 【識別番号】 100091096
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 平木 祐輔
【選任した代理人】
 【識別番号】 100096183
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 石井 貞次
【選任した代理人】
 【識別番号】 100118773
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 藤田 節
【選任した代理人】
 【識別番号】 100101904
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 島村 直己
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 015244
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0217688

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

Lactobacillus属細菌、Salmonella属細菌、Klebsiella属細菌、Listeria属細菌、Clostridium属細菌、Escherichia属細菌、Enterobacter属細菌、Caloramator属細菌、Acetobacterium属細菌、Brucella属細菌、Flavobacterium属細菌、Fusobacterium属細菌、Citrobacter属細菌及びPropionibacterium属細菌から選択される細菌において、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がロックアウトされたロックアウト細菌。

【請求項 2】

pduオペロン及びホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子を有する細菌において、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がロックアウトされたロックアウト細菌。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載の細菌とグリセロールとを接触させることにより、1, 3-プロパンジオール及び／又は3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法。

【請求項 4】

グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディウムサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、ホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子、プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子、並びに1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び／又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子を含み、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含まない、形質転換体。

【請求項 5】

pduオペロンを有し、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含まない、請求項 4 記載の形質転換体。

【請求項 6】

プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である請求項 4 又は 5 記載の形質転換体：

(a) 配列番号 4 1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 4 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 7】

プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のDNAを含む、請求項 4 又は 5 記載の形質転換体：

(a) 配列番号 4 2 で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号 4 2 で表される塩基配列の全部又は一部からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項 8】

プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である請求項 4 又は 5 記載の形質転換体：

(a) 配列番号 4 3 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 4 3 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつプロピオン酸キナーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 9】

プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のDNAを含む、請求

項 4 又は 5 記載の形質転換体：

(a) 配列番号 4 4 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 4 4 で表される塩基配列の全部又は一部からなる DNA に対し相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロピオン酸キナーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 10】

請求項 4 ～ 9 のいずれか 1 項記載の形質転換体とグリセロールとを接触させることにより、1，3－プロパンジオール及び／又は 3－ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 1, 3-プロパンジオール及び／又は3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、*Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Listeria*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Escherichia*属細菌、*Enterobacter*属細菌、*Caloramator*属細菌、*Acetobacterium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Flavobacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Citrobacter*属細菌及び*Propionibacterium*属細菌から選択される細菌において、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がノックアウトされたノックアウト細菌、グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディウムサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、ホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子、プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子、並びに1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び／又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子を含みグリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含まない形質転換体、該細菌又は形質転換体を用いてグリセロールから1, 3-プロパンジオール及び／又は3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

1, 3-プロパンジオールはポリエステル繊維の生産並びにポリウレタン及び環状化合物の製造に使用されるモノマーである。1, 3-プロパンジオール合成経路としては、種々ものが知られている。例えば、ホスフィン、水、一酸化炭素、水素及び酸の存在下、触媒上でのエチレンオキシドの変換により製造する方法；アクロレインの触媒的液相水和、続いての還元により製造する方法；一酸化炭素及び水素存在下、周期律表のV I I I族の原子を持っている触媒上で炭化水素（例えば、グリセロール）を反応させることにより製造する方法などが報告されている。しかしながら、伝統的化学合成法は、費用がかかるとともに、環境汚染物質を含んでいる一連の廃棄物を発生するという問題を有していた。

【0003】

これに対し、1, 3-プロパンジオールを製造するための生物学的方法として、グリセロールから1, 3-プロパンジオールへの発酵を触媒する酵素を有する微生物を利用する方法が報告されている（特許文献1～6参照）。グリセロールから1, 3-プロパンジオールを生産できる細菌株が、例えば、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、*Enterobacter*属、*Salmonella*属、*Klebsiella*属、*Lactobacillus*属、*Caloramator*属及び*Listeria*属に属する細菌の群で発見されている。

【0004】

生物学的系において、グリセロールは2段階の酵素触媒反応を経て、1, 3-プロパンジオールに変換される。第1段階において、グリセロールデヒドラターゼがグリセロールを3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド（3-HPA）及び水へ変換する（グリセロール→3-HPA+H₂O）。第2段階において、3-HPAがNAD⁺結合オキシドレダクターゼにより1, 3-プロパンジオールに還元される（3-HPA+NADH+H⁺→1, 3-プロパンジオール+NAD⁺）。1, 3-プロパンジオールはそれ以上代謝されず、結果として媒体中に堆積する。

【0005】

しかし、生物学的系におけるグリセロールからの1, 3-プロパンジオールの生産は、一般に嫌気性条件下でグリセロールを単独の炭素源とし、他の外因性還元当量受容物質の不在下で行われるため、最初に、NAD⁺（又はNADP⁺）結合グリセロールデヒ

ドロゲナーゼによるグリセロールのジヒドロキシアセトン（DHA）への酸化（グリセロール + $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{DHA} + \text{NADH} + \text{H}$ ）というグリセロールに関する平行経路が働く。そして、DHAは、DHAキナーゼによってジヒドロキシアセトンリン酸へリン酸化され、生合成及びATP生成のために利用される。

【0006】

従って、従来の微生物を用いた1, 3-プロパンジオールの製造方法においては、原料であるグリセロールの半分が上記平行経路において消費され、原料グリセロールに対する生成物の収率が低く、効率性及びコストの点で問題があった。

【0007】

一方、3-ヒドロキシプロピオン酸及びそのエステルは、脂肪族ポリエステルの原料として有用な化合物であり、また、これらから合成されるポリエステルは生分解性の環境にやさしいポリエステルとして注目されている。

【0008】

3-ヒドロキシプロピオン酸は、通常、アクリル酸に対する水の付加により、又はエチレンクロロヒドリンとシアン化ナトリウムとの反応により製造される。アクリル酸を水和する反応は平衡反応であるため、反応率が制限されるという問題があった。エチレンクロロヒドリンの反応の場合は、毒性の強い物質の使用が必要であり、さらに加水分解工程を追加しなくてはならない。この場合、塩化ナトリウム及びアンモニウム塩が大量に生じるという問題がある。

【0009】

【特許文献1】WO98/21339

【特許文献2】WO98/21341

【特許文献3】米国特許第5, 821, 092号

【特許文献4】米国特許第5, 254, 467号

【特許文献5】米国特許第5, 633, 362号

【特許文献6】米国特許第5, 686, 276号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、グリセロールから1, 3-プロパンジオールを製造する際の効率性を改善し、工業上有用なプロセスを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記問題を解決すべく鋭意検討を行った結果、*Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Listeria*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Escherichia*属細菌、*Enterobacter*属細菌、*Caloramator*属細菌、*Acetobacterium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Flavobacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Citrobacter*属細菌及び*Propionibacterium*属細菌のグリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子をノックアウトし、該細菌とグリセロールとを接触させることにより、2種類の有用な化合物を効率的に製造できることを見だし、本発明を完成させるに至った。

【0012】

また、本発明者らは、上記細菌におけるpduオペロンが上記反応に関与することを見いだした。

【0013】

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) *Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Listeria*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Escherichia*属細菌、*Enterobacter*属細菌、*Caloramator*属細菌、*Acetobacterium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Flavobacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Citrobacter*属細菌及び*Propionibacterium*属細菌から選択される細菌においてグリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がノックアウトされたノックアウト細菌。

(2) pdu オペロン及びホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子を有する細菌において、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がロックアウトされたロックアウト細菌。

(3) (1) 又は (2) 記載の細菌とグリセロールとを接触させることにより、1, 3-プロパンジオール及び／又は3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法。

【0014】

(4) グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディウムサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、ホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子、プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子、並びに1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び／又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子を含み、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含まない、形質転換体。

(5) pdu オペロンを有し、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含まない、(4) 記載の形質転換体。

【0015】

(6) プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である(4)又は(5)記載の形質転換体：

(a) 配列番号41で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号41で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

【0016】

(7) プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のDNAを含む、(4)又は(5)記載の形質転換体：

(a) 配列番号42で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号42で表される塩基配列の全部又は一部からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【0017】

(8) プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である(4)又は(5)記載の形質転換体：

(a) 配列番号43で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号43で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつプロピオン酸キナーゼ活性を有するタンパク質。

【0018】

(9) プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のDNAを含む、(4)又は(5)記載の形質転換体：

(a) 配列番号44で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号44で表される塩基配列の全部又は一部からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロピオン酸キナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【0019】

(10) (4)～(9)のいずれかに記載の形質転換体とグリセロールとを接触させることにより、1, 3-プロパンジオール及び／又は3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法。

【発明の効果】

【0020】

本発明により、グリセロールから1, 3-プロパンジオールを製造する際の原料グリセロールのロスを低減し、かつ1, 3-プロパンジオールと合わせて3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することができる。また、製造に用いる細菌を効率的に培養できるため、より効率的に1, 3-プロパンジオールと合わせて3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

本発明の細菌は、*Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Listeria*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Escherichia*属細菌、*Enterobacter*属細菌、*Caloramator*属細菌、*Acetobacterium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Flavobacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Citrobacter*属細菌及び*Propionibacterium*属細菌から選択される細菌において、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がノックアウトされているものである。本発明において、*Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Listeria*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Escherichia*属細菌、*Enterobacter*属細菌、*Caloramator*属細菌、*Acetobacterium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Flavobacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Citrobacter*属細菌及び*Propionibacterium*属細菌は、グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディウムサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、ホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子、プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子、ならびに1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び／又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子を有するものであれば特に制限されない。

【0022】

本発明においては、さらに、補酵素B12合成系を有する細菌が好ましく、そのような細菌としては、*Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Brucella*属細菌、*Fusobacterium*属細菌及び*Propionibacterium*属細菌が挙げられる。

【0023】

*Lactobacillus*属細菌としては、*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus collinoides*、*Lactobacillus hilgardii*、*Lactobacillus diolivorans*、*Lactobacillus buchneri*、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus johnsonii*、*Lactobacillus yamashiensis*等が挙げられる。

【0024】

*Salmonella*属細菌としては、*Salmonella enterica*、*Salmonella enteritidis*、*Salmonella typhi*、*Salmonella typhimurium*が挙げられ、*Klebsiella*属細菌としては、*Klebsiella aerogenes*、*Klebsiella oxytoca*、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella atlantae*、*Klebsiella edwardsii*、*Klebsiella mobilis*、*Klebsiella ozaenae*、*Klebsiella planticola*、*Klebsiella rhinoscleromatis*、*Klebsiella rubiacearum*、*Klebsiella terrigena*が挙げられ、*Listeria*属細菌としては、*Listeria denitrificans*、*Listeria grayi*、*Listeria innocua*、*Listeria ivanovii*、*Listeria monocytogenes*、*Listeria murrayi*、*Listeria seeligeri*、*Listeria welshimeri*が挙げられ、*Clostridium*属細菌としては、*Clostridium acetobutylicum*、*Clostridium butyricum*、*Clostridium pasteurianum*、*Clostridium paraperfringens*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium glycolicum*、*Clostridium difficile*が挙げられ、*Escherichia*属細菌としては、*Escherichia blattae*、*Escherichia hermannii*、*Escherichia vulneris*、*Escherichia freundii*が挙げられ、*Enterobacter*属細菌としては、*Enterobacter aerogenes*、*Enterobacter agglomerans*が挙げられ、*Caloramator*属細菌としては、*Caloramator coolhaasii*、*Caloramator fervidus*、*Caloramator indic*

us、Caloramator proteoclasticus、Caloramator uzoniensis、Caloramator viterbiensisが挙げられ、Acetobacterium属細菌としては、Acetobacterium sp.が挙げられ、Brucella属細菌としては、Brucella melitensisが挙げられ、Flavobacterium属細菌としては、Flavobacterium sp.が挙げられ、Fusobacterium属細菌としては、Fusobacterium nucleatumが挙げられ、Citrobacter属細菌としては、Citrobacter freundiiが挙げられる。

【0025】

Propionibacterium属菌としては、Propionibacterium acidipropionici、Propionibacterium acnes、Propionibacterium australiense、Propionibacterium avidum、Propionibacterium cyclohexanicum、Propionibacterium granulosum、Propionibacterium jensenii、Propionibacterium microaerophilum、Propionibacterium propionicum、Propionibacterium thoenii、Propionibacterium freudenreichiiが挙げられる。

【0026】

本発明においては、好ましくはLactobacillus属細菌、より好ましくはLactobacillus reuteri、特に好ましくはLactobacillus reuteri JCM1112株、好ましくはKlebsiella属細菌、より好ましくはKlebsiella pneumoniae、Klebsiella oxytoca、特に好ましくはKlebsiella pneumoniae ATCC 25955株、Klebsiella oxytoca ATCC 8724株を用いる。

【0027】

本発明の細菌は、上記細菌においてグリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がロックアウトされたものであり、該遺伝子をロックアウトすることにより、グリセロールが酸化されてジヒドロキシアセトンに変換される経路を遮断することができ、より高い収率で1，3-プロパンジオール及び／又は3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することができる。

【0028】

グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がロックアウトされたとは、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子が破壊されて発現できないような状況にあることを意味する。具体的には、該ロックアウト細菌は、細胞中のグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子を標的遺伝子として、標的遺伝子の任意の位置で相同組換えを起こすベクター（ターゲティングベクター）を用いて当該遺伝子を破壊する方法（ジーンターゲティング法）や、標的遺伝子の任意の位置にトラップベクター（プロモーターを持たないレポーター遺伝子）を挿入して当該遺伝子を破壊しその機能を失わせる方法（遺伝子トラップ法）、それらを組み合わせた方法等の通常当技術分野でロックアウト細胞、トランスジェニック動物（ロックアウト動物含む）等を作製する際に用いられる方法を用いて該細胞中のグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊することによって作製される。相同置換を起こす位置又はトラップベクターを挿入する位置は、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子の発現の消失をもたらす変異を生じる位置であれば特に限定されないが、好ましくは転写調節領域、より好ましくは第2エクソンを置換する。またグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子をロックアウトする他の方法としては、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子のアンチセンスcDNAを発現するベクターを導入する方法や、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子の2重鎖RNAを発現するベクターを細胞に導入する方法が挙げられる。当該ベクターとしては、ウイルスベクターやプラスミドベクター等が包含され、通常の遺伝子工学的手法に基づき、例えばMolecular cloning 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に従い作製することができる。又、市販されているベクターを任意の制限酵素で切断し所望の遺伝子等を組み込んで半合成することもできる。

【0029】

グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子がロックアウトされているか否かは、該ベクターが導入された細胞についてサザンブロットを行い正しく相同組換えが起こっていることを確認することによって、ターゲティングベクターに宿主細胞が有しない薬剤耐性遺伝子を入れておき薬剤耐性の形質が組み込まれたものを選抜することによって、破壊導入後、選抜した株のゲノム、菌体、菌体培養液等をテンプレートにして、破壊するグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子のF側とR側のプライマーを用いてPCRをかけ、グリセロールデ

ヒドロゲナーゼ遺伝子と破壊導入部位の配列を合わせた大きさのDNA断片の増幅を確認することによって、もしくはそれをクローニングして配列解析することによって、又はジヒドロキシアセトンが生成しないことを確認することによって知ることができる。

【0030】

本発明においてLactobacillus属細菌、Salmonella属細菌、Klebsiella属細菌、Listeria属細菌、Clostridium属細菌、Escherichia属細菌、Enterobacter属細菌、Caloramator属細菌、Acetobacterium属細菌、Brucella属細菌、Flavobacterium属細菌、Fusobacterium属細菌、Citrobacter属細菌及びPropionibacterium属細菌は、pduオペロン及びホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子を有し、かつグリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がロックアウトされているものが好ましい。

【0031】

また、Lactobacillus属細菌、Salmonella属細菌、Klebsiella属細菌、Listeria属細菌、Clostridium属細菌、Escherichia属細菌、Enterobacter属細菌、Caloramator属細菌、Acetobacterium属細菌、Brucella属細菌、Flavobacterium属細菌、Fusobacterium属細菌、Citrobacter属細菌及びPropionibacterium属細菌以外の細菌であっても、pduオペロン及びホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子を有する細菌において、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がロックアウトされた細菌もまた本発明に包含される。

【0032】

pduオペロンとは、多面小胞体タンパク質をコードする遺伝子を含み、該多面小胞体の中でグリセリンを含む1, 2-ジオール類から誘導されるアルデヒドを一定時間滞留させるとともに、小胞体内、小胞体膜、およびその近傍において、アルデヒドからの酸やアルコールへの反応を触媒し、アルデヒドによる菌体への直接の悪影響を減じる機能を有するものと考えられる。

【0033】

従って、pduオペロンを有する微生物は、菌体中に多面小胞体を形成し、ジオール類を一旦小胞体内に取り込み、脱水により得られるアルデヒドをある程度保持して菌体の生育に悪影響が及ばないようにするものと考えられる。したがって、アルデヒドの酸化又は還元反応は、多面小胞体内、小胞体膜あるいはその近傍で起こっていると考えられる。従って、本発明の細菌は、pduオペロンのうちの直接反応に関与するオペロンだけでなく、多面小胞体形成タンパク等をコードするorf、さらにはpduオペロンに含まれるその他のorfを含むことが好ましい。

【0034】

pduオペロンの構造を図1に示し、pduオペロンの塩基配列を配列番号53に示す。また、以下に、各orfとその機能及びLactobacillus reuteri JCM1112株由来の塩基配列を示す。なお、orf1~4はpduオペロンとは無関係であると考えられる。また、pduObisについても本発明に係る反応には無関係であると考えられる。

pduF	グリセロール摂取促進因子（配列番号54）
orf1	エタノールアミン利用系のEutJ（配列番号55）
pocR	転写制御因子（配列番号56）
pduAB	多面小体構成タンパク質（配列番号57及び58）
pduCDE	ジオールデヒドラターゼ（配列番号2、6、10）
pduGH	ジオールデヒドラターゼ再活性化因子（配列番号20及び24）
pduJK	多面小体構成タンパク質（配列番号60及び59）
pduLM	不明（配列番号61及び62）
pduN	多面小体構成タンパク質（配列番号63）
pduObis	アデノシルトランスフェラーゼ（配列番号64及び65）
pduP	プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ（配列番号42）
pduQ	プロパンジオールオキシドレダクターゼ（配列番号14）
pduW	プロピオン酸キナーゼ（配列番号44）

p d u U	多面小体構成タンパク質（配列番号66）
o r f 2	チロシンホスファターゼ（配列番号67）
o r f 3	ホスホグリセレートムターゼ（配列番号68）
o r f 4	カドミウム耐性（輸送タンパク質）（配列番号69）
p d u V	不明（配列番号70）

【0035】

そして、本発明者らは、p d u オペロン有する *Lactobacillus* 属細菌において、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子をノックアウトすることにより、図2に示す機構に基づき、グリセロールから1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸が生成されることを見いだした。

【0036】

図2の作用機構において、酵素の活性を考慮すると、ジオールデヒドラターゼ及びジオールデヒドラターゼ再活性化因子は、グリセロールデヒドラターゼ及びグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子に置換可能であり、プロパンジオールオキシドレダクターゼは、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼに置換可能であり、同様の反応が生じる。

【0037】

本発明者らは、上記知見に基づき、グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディウムサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、ホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子、プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子、並びに1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び／又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子を含み、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含まない形質転換体をグリセロールの存在下で培養することによっても、1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を製造できることを見いだした。

【0038】

本発明の形質転換体は、グリセロールを脱水して、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド及び水へ変換する反応を触媒する酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む。そのようなタンパク質としては、グリセロールデヒドラターゼ及びジオールデヒドラターゼが挙げられる。グリセロールデヒドラターゼ及びジオールデヒドラターゼは、ラージサブユニット、ミディウムサブユニット及びスモールサブユニットの3種のサブユニットから構成される。本発明の形質転換体には、グリセロールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもの、ジオールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもの、ならびにグリセロールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子とジオールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもののいずれをも包含する。

【0039】

グリセロールデヒドラターゼ又はジオールデヒドラターゼの各サブユニットをコードする遺伝子としては、公知のものを使用でき、例えば、*Lactobacillus* 属、*Citrobacter* 属、*Clostridium* 属、*Klebsiella* 属、*Enterobacter* 属、*Caloramator* 属、*Salmonella* 属、及び *Listeria* 属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、*Lactobacillus* 属細菌に由来するグリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼの各サブユニットの遺伝子、特に *Lactobacillus reuteri* 由来のグリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼの各サブユニットの遺伝子、さらに *Lactobacillus reuteri* JCM1112株及び *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株由来のグリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼの各サブユニットの遺伝子が好ましい。

【0040】

*Lactobacillus reuteri*由来のグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットのアミノ酸配列を配列番号1及び3に、ミディアムサブユニットのアミノ酸配列を配列番号5及び7に、スモールサブユニットのアミノ酸配列を配列番号9及び11に例示する。*Lactobacillus reuteri*由来のグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号2及び4に、ミディアムサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号6及び8に、スモールサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号10及び12に、例示する。

【0041】

各アミノ酸配列を含むタンパク質は、その他2種のサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有する限り、各アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じていてもよい。

【0042】

また、各配列番号で表される塩基配列からなるDNAの全部又は一部の塩基配列からなるDNAに対し相補的な配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、その他2種のサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いる場合も本発明に含まれる。

【0043】

各サブユニットをコードする遺伝子は、同一の宿主で発現させる限り、同一のベクターに導入して形質転換を行ってもよいし、別々のベクターに導入して形質転換を行ってもよい。また、3種のサブユニットは、同一の種又は同一の株に由来するものを用いるのが好ましい。

【0044】

本発明の形質転換体は、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを還元し、プロパンジオールに変換する反応を触媒することができる酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む。そのようなタンパク質をコードする遺伝子としては、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及びプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子が挙げられる。

【0045】

プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子は、公知のものを使用でき、例えば、*Lactobacillus*属、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、*Klebsiella*属、*Enterobacter*属、*Caloramator*属、*Salmonella*属、及び*Listeria*属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、*Lactobacillus*属細菌に由来するプロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子、特に*Lactobacillus reuteri*由来のプロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子、さらに*Lactobacillus reuteri* JCM1112株及び*Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株由来のプロパンジオールオキシドレダクターゼが好ましい。

【0046】

配列番号13及び15に*Lactobacillus reuteri*由来のプロパンジオールオキシドレダクターゼのアミノ酸配列を、配列番号14及び16に*Lactobacillus reuteri*由来のプロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の塩基配列を例示する。これらのアミノ酸配列を含むタンパク質がプロパンジオールオキシドレダクターゼ活性を有する限り、配列番号13で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じていてもよい。

【0047】

また、配列番号14及び16で表される塩基配列からなるDNAの全部又は一部の塩基配列からなるDNAに対し相補的な配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いる場合も本発明に含まれる。

【0048】

1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子は、公知のものを

使用でき、例えば、*Lactobacillus*属、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、*Klebsiella*属、*Enterobacter*属、*Caloramator*属、*Salmonella*属、及び*Listeria*属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、*Lactobacillus*属細菌に由来する1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子、特に*Lactobacillus reuteri*由来の1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子、さらに*Lactobacillus reuteri* JCM1112株由来の1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子が好ましい。

【0049】

配列番号17に*Lactobacillus reuteri*由来の1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼのアミノ酸配列を、配列番号18に*Lactobacillus reuteri*由来の1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の塩基配列を例示する。これらのアミノ酸配列を含むタンパク質が1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性を有する限り、配列番号17で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じていてもよい。

【0050】

また、配列番号18で表される塩基配列からなるDNAの全部又は一部の塩基配列からなるDNAに対し相補的な配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いる場合も本発明に含まれる。

【0051】

本発明の形質転換体は、グリセロールの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド及び水への変換反応を触媒することにより失活したグリセロールデヒドラターゼ又はジオールデヒドラターゼにおける反応中心部分の補酵素B12を入れ替えて、再度活性を取り戻させる役割を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む。そのようなタンパク質としては、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及びジオールデヒドラターゼ再活性化因子が挙げられる。グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及びジオールデヒドラターゼ再活性化因子は、ラージサブユニット及びスモールサブユニットの2種のサブユニットから構成される。本発明の形質転換体には、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもの、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもの、ならびにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子とジオールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもののいずれをも包含する。

【0052】

同様の作用を有するものであれば、特に制限なく使用できる。グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子としては、WO 98/21341; Daniel et al., J. Bacteriol., 177, 2151(1995); Toraya and Mori, J. Biol. Chem., 274, 3372(1999); 及び Tobimatsu et al., J. Bacteriol., 181, 4110(1999)に記載のものなどが挙げられる。

【0053】

グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットをコードする遺伝子としては、一般に嫌気条件下でグリセロールを資化することのできる細菌群が有するg d hレギュロン、p d uオペロンと呼ばれる遺伝子群内に存在するものが含まれ、例えば、g d r A、g d r B、p d u G、p d u H、d d r A、d d r B、d h a F、d h a G、o r f Z、及びo r f Yなどが挙げられる。

【0054】

グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットをコードする遺伝子としては、公知のものを使用でき、例えば、*Lactobacillus*属、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、*Klebsiella*属、*Enterobacter*属、*Caloramator*属、*Salmonella*属、及び*Listeria*属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、*Lactobacillus*属細菌に由来するグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットの遺伝子、

特に*Lactobacillus reuteri*由来のグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットの遺伝子、さらに*Lactobacillus reuteri* JCM1112株及び*Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株由来のグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットの遺伝子が好ましい。

【0055】

好ましくは、グリセロールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含む形質転換体は、少なくともグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含み、ジオールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含む形質転換体は、少なくともジオールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含む。

【0056】

*Lactobacillus reuteri*由来のグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットのアミノ酸配列を配列番号19及び21に、スモールサブユニットのアミノ酸配列を配列番号23及び25に例示する。*Lactobacillus reuteri*由来のグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号20及び22に、スモールサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号24及び26に、例示する。

【0057】

各アミノ酸配列を含むタンパク質は、もう一方のサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子活性を有する限り、各アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じていてもよい。

【0058】

また、各配列番号で表される塩基配列からなるDNAの全部又は一部の塩基配列からなるDNAに対し相補的な配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、もう一方のサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いる場合も本発明に含まれる。

【0059】

本発明の形質転換体は、プロピオンアルデヒドにCoAを追加し、プロピオニル-CoAを生成する反応を触媒することができる酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む。そのようなタンパク質をコードする遺伝子としては、プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が挙げられる。

【0060】

プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、公知のものを使用でき、例えば、*Lactobacillus*属、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、*Klebsiella*属、*Enterobacter*属、*Caloramator*属、*Salmonella*属、及び*Listeria*属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、*Lactobacillus*属細菌に由来するプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子、特に*Lactobacillus reuteri*由来のプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子、さらに*Lactobacillus reuteri* JCM1112株由来のプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子が好ましい。

【0061】

配列番号41に*Lactobacillus reuteri*由来のプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を、配列番号42に*Lactobacillus reuteri*由来のプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の塩基配列を例示する。これらのアミノ酸配列を含むタンパク質がプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する限り、配列番号41で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じていてもよい。

【0062】

また、配列番号42で表される塩基配列からなるDNAの全部又は一部の塩基配列からなるDNAに対し相補的な配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、

プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いる場合も本発明に含まれる。

【0063】

本発明の形質転換体は、プロピオニルC o AからC o Aをはずし、リン酸を付加してプロピオニルリン酸を生成する反応を触媒することができる酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む。そのようなタンパク質をコードする遺伝子としては、ホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子が挙げられる。

【0064】

ホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子は、公知のものを使用でき、例えば、Lactobacillus属、Citrobacter属、Clostridium属、Klebsiella属、Enterobacter属、Caloramator属、Salmonella属、及びListeria属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、Lactobacillus属細菌に由来するホスホトランスアシラーゼ遺伝子、特にLactobacillus reuteri由来のホスホトランスアシラーゼ遺伝子、さらにLactobacillus reuteri JCM1112株由来のホスホトランスアシラーゼ遺伝子が好ましい。

【0065】

本発明の形質転換体は、プロピオニルリン酸からリン酸をはずし、A D Pに付加してA T Pを生成すると同時にプロピオン酸を生成する反応を触媒することができる酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む。そのようなタンパク質をコードする遺伝子としては、プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子が挙げられる。

【0066】

このような酵素活性を有する遺伝子を含むことにより、1，3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸が生成する反応と同時にA T Pが生成され、形質転換体が効率的に増殖し、培養を効率的に実施することができる。

【0067】

プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子は、公知のものを使用でき、例えば、Lactobacillus属、Citrobacter属、Clostridium属、Klebsiella属、Enterobacter属、Caloramator属、Salmonella属、及びListeria属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、Lactobacillus属細菌に由来するプロピオン酸キナーゼ遺伝子、特にLactobacillus reuteri由来のプロピオン酸キナーゼ遺伝子、さらにLactobacillus reuteri JCM1112株由来のプロピオン酸キナーゼ遺伝子が好ましい。

【0068】

配列番号43にLactobacillus reuteri由来のプロピオン酸キナーゼのアミノ酸配列を、配列番号44にLactobacillus reuteri由来のプロピオン酸キナーゼ遺伝子の塩基配列を例示する。これらのアミノ酸配列を含むタンパク質がプロピオン酸キナーゼ活性を有する限り、配列番号43で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じていてもよい。

【0069】

また、配列番号44で表される塩基配列からなるD N Aの全部又は一部の塩基配列からなるD N Aに対し相補的な配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プロピオン酸キナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いる場合も本発明に含まれる。

【0070】

本明細書において、各配列番号で表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じたアミノ酸配列とは、各配列番号で表されるアミノ酸配列の1個、又は好ましくは10～20個、より好ましくは5～10個、さらに好ましくは2～3個のアミノ酸が欠失してもよく、又は各配列番号で表されるアミノ酸配列に1個、又は好ましくは、10～20個、より好ましくは5～10個、さらに好ましくは2～3個のアミノ酸が付加してもよく、又は、各配列番号で表されるアミノ酸配列の1個、又は好ましくは、10～20個、より好ましくは5～10個、さらに好ましくは2～3個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよいことを意味する。

【0071】

本明細書において、ストリンジェントな条件とは、特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいい、すなわち、各遺伝子に対し高い相同性（相同性が90%以上、好ましくは95%以上）を有するDNAがハイブリダイズする条件をいう。より具体的には、このような条件は、0.5～1MのNaCl存在下42～68℃で、又は50%ホルムアミド存在下42℃で、又は水溶液中65～68℃で、ハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC (saline sodium citrate) 溶液を用いて室温～68℃でフィルターを洗浄することにより達成できる。

【0072】

ここで、「一部の配列」とは、各遺伝子の塩基配列の一部を含むDNAの塩基配列であって、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせるのに十分な塩基配列の長さを有するもの、例えば、少なくとも50塩基、好ましくは少なくとも100塩基、より好ましくは少なくとも200塩基の配列である。

【0073】

なお、遺伝子に変異を導入するには、Kunkel法、Gapped duplex法等の公知の手法又はこれに準ずる方法により、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMutan-K（TAKARA社製）、Mutan-G（TAKARA社製））などを用いて、又は、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesisシリーズキットを用いて行うことができる。なお、上記手法により塩基配列が決定された後は、化学合成によって、又は染色体DNAを鋳型としたPCR法によって、又は該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の遺伝子を得ることができる。

【0074】

形質転換体の作成

本発明の形質転換体は、上記4種の遺伝子又はその一部を適当なベクターに連結し、得られた組換えベクターを本発明の遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。「一部」とは、宿主中に導入された場合に各遺伝子がコードするタンパク質を発現することができる各遺伝子の一部分を指す。

【0075】

バクテリアゲノムから所望の遺伝子を得る方法は、分子生物学の分野において周知である。例えば遺伝子の配列が既知の場合、制限エンドヌクレアーゼ消化により適したゲノムライブラリを作り、所望の遺伝子配列に相補的なプローブを用いてスクリーニングすることができる。配列が単離されたら、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（米国特許第4,683,202号）のような標準的増幅法を用いてDNAを増幅し、形質転換に適した量のDNAを得ることができる。

【0076】

本発明においては、グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディウムサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、ホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子、プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子、並びに1,3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び／又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子は、別々にベクターに導入して複数のベクターで形質転換を実施してもよいし、複数種の遺伝子を1つのベクターに導入して形質転換を行ってもよい。

【0077】

本発明の遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主細胞で複製可能なものであれば特に限定されず、例えばプラスミドDNA、ファージDNA、コスミドDNA等が挙げられる。プラスミドDNAとしては、例えばpBR322、pSC101、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、pACYC117、pBluescript I I

SK (+)、pETDuet-1、pACYCDuet-1等が挙げられ、ファージDNAとしては、例えばλgt10、Charon 4A、M13mp18、M13mp19等が挙げられる。

【0078】

宿主としては、目的とする遺伝子を発現できるものであれば特に限定されず、例えば、*Ralstonia*属細菌、*Pseudomonas*属細菌、*Bacillus*属細菌、*Escherichia*属細菌、*Propionibacterium*属細菌、*Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Acetobacterium*属細菌、*Flavobacterium*属細菌、*Citrobacter*属細菌、*Agrobacterium*属細菌、*Anabaena*属細菌、*Bradyrhizobium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Chlorobium*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Corynebacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Geobacter*属細菌、*Gloeobacter*属細菌、*Leptospira*属細菌、*Mycobacterium*属細菌、*Mycobacterium*属細菌、*Photobacterium*属細菌、*Porphyromonas*属細菌、*Prochlorococcus*属細菌、*Rhodobacter*属細菌、*Rhodopseudomonas*属細菌、*Sinorhizobium*属細菌、*Streptomyces*属細菌、*Synechococcus*属細菌、*Thermosynechococcus*属細菌、*Treponema*属細菌、*Archaeoglobus*属始原菌、*Halobacterium*属始原菌、*Mesorhizobium*属始原菌、*Methanobacterium*属始原菌、*Methanococcus*属始原菌、*Methanopyrus*属始原菌、*Methanosarcina*属始原菌、*Methanosarcina*属始原菌、*Pyrobaculum*属始原菌、*Sulfolobus*属始原菌、*Thermoplasma*属始原菌、具体的には、*Acetobacterium* sp.、*Citrobacter freundii*、*Flavobacterium* sp.、*Ralstonia solanacearum*、*Ralstonia eutropha*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas denitrificans*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus megaterium*、*Escherichia coli*、*Propionibacterium acidipropionici*、*Propionibacterium acnes*、*Propionibacterium australiense*、*Propionibacterium avidum*、*Propionibacterium cyclohexanicum*、*Propionibacterium granulosum*、*Propionibacterium jensenii*、*Propionibacterium microaerophilum*、*Propionibacterium propionicum*、*Propionibacterium thoenii*、*Propionibacterium freudenreichii*、*Agrobacterium tumefaciens*、*Anabaena* sp.、*Bradyrhizobium japonicum*、*Brucella melitensis*、*Brucella suis*、*Chlorobium tepidum*、*Clostridium tetani*、*Clostridium glycolicum*、*Clostridium difficile*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Fusobacterium nucleatum*、*Geobacter sulfurreducens*、*Gloeobacter violaceus*、*Leptospira interrogans*、*Mycobacterium bovis*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Photobacterium luminescens*、*Porphyromonas gingivalis*、*Prochlorococcus marinus*、*Rhodobacter capsulatus*、*Rhodopseudomonas palustris*、*Sinorhizobium meliloti*、*Streptomyces avermitilis*、*Streptomyces coelicolor*、*Synechococcus* sp.、*Thermosynechococcus elongatus*、*Treponema denticola*、*Archaeoglobus fulgidus*、*Halobacterium* sp.、*Mesorhizobium loti*、*Methanobacterium thermoautotrophicum*、*Methanococcus jannaschii*、*Methanopyrus kandleri*、*Methanosarcina acetivorans*、*Methanosarcina mazei*、*Pyrobaculum aerophilum*、*Sulfolobus solfataricus*、*Sulfolobus tokodaii*、*Thermoplasma acidophilum*、*Thermoplasma volcanium*が挙げられる。

【0079】

また、*Saccharomyces cerevisiae*などの*Saccharomyces*属に属する酵母、*Candida maltosa*などの*Candida*属に属する酵母、COS細胞、CHO細胞、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などの動物細胞、SF9細胞などの昆虫細胞などを使用できる。

【0080】

本発明においては、補酵素B12合成系を有するものを宿主として使用するのが好ましい。例えば、*Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Propionibacterium*属細菌、*Agrobacterium*属細菌、*Anabaena*属細菌、*Bacillus*属細菌、*Bradyrhizobium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Chlorobium*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Corynebacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Geobacter*属細菌、*Gloeobacter*属細菌、*Leptospira*属細菌、*Mycobacterium*属細菌、*Mycobacterium*属細菌、*Photobacterium*属細菌、*Porphyromonas*属細菌、*Prochlorococcus*属細菌、*Pseudomonas*属細菌、*Ralstonia*属細菌、*Rhodobacter*属細菌、*Rhodopseudomonas*属細菌、*Sinorhizobium*属細菌、*Streptomyces*属細菌、*Synechococcus*

us属細菌、Thermosynechococcus属細菌、Treponema属細菌、Archaeoglobus属始原菌、Halobacterium属始原菌、Mesorhizobium属始原菌、Methanobacterium属始原菌、Methanococcus属始原菌、Methanopyrus属始原菌、Methanosarcina属始原菌、Methanosarcina属始原菌、Pyrobaculum属始原菌、Sulfolobus 属始原菌、Thermoplasma属始原菌、好ましくはPropionibacterium属細菌、特にPropionibacterium freudenreichiiを宿主として使用する。あるいは、補酵素B₁₂合成遺伝子を組み換えにより導入した宿主を用いてもよい。

【0081】

宿主細胞においては、グリセロールデヒドロゲナーゼを発現しない宿主細胞、すなわちグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子を有しない細胞及びグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子をノックアウトした細胞を使用する。これらを用いることにより、グリセロールが酸化されてジヒドロキシアセトンに変換される経路を遮断することができ、より高い収率で1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することができる。グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子をノックアウトする方法については、上記と同様の方法を使用できる。

【0082】

大腸菌等の細菌を宿主として用いる場合は、組換えベクターが該宿主中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、目的とするDNA、転写終結配列を含む構成であることが好ましい。発現ベクターとしては、広範囲の宿主において複製・保持されるRK2複製起点を有するpLA2917 (ATCC 37355) やRSF1010複製起点を有するpJRD215 (ATCC 37533) 等が挙げられる。

【0083】

プロモーターとしては、宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、T7プロモーターなどの大腸菌やファージ等に由来するプロモーターが用いられる。細菌への組換えベクターの導入方法としては、特に限定されないが、例えばカルシウムイオンを用いる方法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1, 181 (1994)) やエレクトロポレーション法等が挙げられる。

【0084】

酵母を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして、例えばYE p13、YC p50等が挙げられる。プロモーターとしては、例えばgal₁プロモーター、gal₁₀プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、GAPプロモーター等が挙げられる。酵母への組換えベクターの導入方法としては、特に限定されないが、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 192, 9-1933 (1978))、酢酸リチウム法 (J. Bacteriol., 153, 163-168 (1983)) 等が挙げられる。

【0085】

動物細胞を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えばpcDNA1、pcDNA1/Amp (インビトロジェン社) 等が用いられる。プロモーターとしては、例えば、SR α プロモーター、SV40プロモーター、CMVプロモーター等が挙げられる。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、特に限定されないが、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

【0086】

遺伝子の単離及び形質転換体の作成については、Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Pressに記載されている。

【0087】

1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸の製造

本発明において、1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸の製造は、本発明の細菌又は形質転換体とグリセロールとを接触させ、反応生成物（培養菌体又は培養上清）中に1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を蓄積させ、

1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を採取することにより実施できる。

【0088】

本発明の細菌又は形質転換体とグリセロールとを接触させるとは、グリセロールの存在下で本発明の細菌又は形質転換体を培養すること、また、本発明の細菌又は形質転換体の培養物の処理物を用いて反応を行うことを包含する。該処理物としては、菌死体、菌体破砕物、菌体破砕物又は培養上清から調製した粗酵素、精製酵素等が挙げられる。また、常法により担体に固定化した菌体、該処理物、酵素等を用いることができる。

【0089】

本発明の細菌又は形質転換体を培養する方法は、通常の方法に従って、炭素源としてグリセロールを用いることにより行われる。例えば、比較的リッチな培地、例えば2培地等を用いて好気培養し、菌体量を増やしてから嫌気条件にし、グリセロールを与えて発酵を行う。pHは、宿主の生育を妨害せず、かつ発酵液から酸を分離するときの障害とならない試薬を用いて調整する。炭酸ナトリウム、アンモニア、ナトリウムイオン供給源、例えば塩化ナトリウムを添加してもよい。また、水酸化ナトリウム水溶液、水酸化カリウム水溶液、水酸化ナトリウム水溶液、水酸化アンモニウム水溶液、水酸化カルシウム水溶液、炭酸カリウム水溶液、炭酸ナトリウム水溶液、酢酸カリウム水溶液等の一般的なアルカリ試薬を用いてもよい。培養期間中pHは、5.0～8.0、好ましくは5.5～7.5に保持する。

【0090】

窒素源としては、例えば、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイプリカー等が挙げられる。また、無機物としては、例えば、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。

【0091】

培養中は、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、インデューサーを培地に添加することもできる。例えば、イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）、インドール酢酸（IAA）等を培地に添加することができる。

【0092】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えばRPMI-1640、DMEM培地又はこれらの培地にウシ胎児血清を添加した培地が用いられる。培養は、通常5%CO₂存在下、30～40℃で1～30日間行う。培養中はカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0093】

あるいは、上記において得られた細菌又は形質転換体の培養物から遠心分離などによって集菌を行い、適当なバッファに懸濁する。この菌体懸濁液をグリセロールを含むバッファに懸濁し、反応を行うことによって、1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することができる。反応の条件は、例えば、反応温度は10～80℃、好ましくは15～50℃、反応時間は5分～96時間、好ましくは10分～72時間、pHは5.0～8.0、好ましくは5.5～7.5である。

【0094】

培養培地からの1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸の精製法は当該技術分野において周知である。例えば、有機溶媒を用いる抽出、蒸留及びカラムクロマトグラフィーに反応混合物を供することにより、培地から1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を得ることができる（米国特許第5, 356, 812号）。また、限外濾過膜や水などの低分子のみが透過できるゼオライト分離膜などで発酵液の濃縮を行うのが好ましい。濃縮を行うことにより、水を蒸発させるためのエネルギーを低

減することができる。

【0095】

培地を高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）分析にかけることにより、1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を直接同定することもできる。

【実施例】

【0096】

（実施例1）グリセロールデヒドラターゼ遺伝子の取得

合成オリゴヌクレオチドプライマー（フォワードプライマー：5'-ATGAAACGTCAAAAACGATTGAAGAACTAGAAAAAC-3'（配列番号27）、リバープライマー：5'-TTAGTTATCGCCCTTTAGCTTCTTACGACTTT-3'（配列番号28）を作成し、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のゲノムを鋳型にして、以下の条件でPCR反応を実施した。

【0097】

PCR反応組成（ μ l）

10×Buffer	KOD plus	5
2mM	dNTPs	5
25mM	MgSO ₄	2
ゲノム	111ng / μ l	1
KOD plus		1
水		34
フォワードプライマー	20 pM	1
リバープライマー	20 pM	1
反応系体積	計	50

【0098】

反応サイクル：（94℃ 2分×1、94℃ 15秒、45～65℃ 30秒、68℃ 5分）×30回、4℃ ∞。

【0099】

断片溶液にTaqプレミックスを等量加えて、72℃で10分、3' A-オーバーハング処理し、精製したサンプルをpCR4-TOPにTAクローニングした。シーケンサーはABIのPEISM310、3100を使用した。その結果、配列番号2で示されるグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列、配列番号6で示されるグリセロールデヒドラターゼのミディアムサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列、並びに配列番号10で示されるグリセロールデヒドラターゼのsmallサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

【0100】

また、フォワードプライマー：5'-ATGAAACGTCAAAAACGTTTTGAAGAACTA-3'（配列番号29）、リバープライマー：5'-CTAGTTATCACCCCTTGAGCTTCTTT-3'（配列番号30）を作成し、*Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株のゲノムを鋳型にして、上記と同様にPCR反応及びDNAシーケンセスを実施した。その結果、配列番号4で示されるグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列、配列番号8で示されるグリセロールデヒドラターゼのミディアムサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列、並びに配列番号12で示されるグリセロールデヒドラターゼのsmallサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

【0101】

（実施例2）プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の取得

フォワードプライマー：5'-ATGGGAGGCATAATTCCAATGGAAAAATA-3'（配列番号31）、リバープライマー：5'-TTAACGAATTATTGCTTCGTAAACCATCTTC-3'（配列番号32）を作成し、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシーケンセスを実施した。その結果、配列番号14で示されるプロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の塩基配列を決定した。

【0102】

また、フォワードプライマー：5'-ATGGGAGGCATAATGCCGATG-3'（配列番号33）、リバープライマー：5'-TTAACGAATTATTGCTTCGTAAATCATCTTC-3'（配列番号34）を作成し、*Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシーケンスを実施した。その結果、配列番号16で示されるプロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の塩基配列を決定した。

【0103】

（実施例3）1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の取得

フォワードプライマー：5'-ATGAATAGACAATTTGATTTCTTAATGCCAAG-3'（配列番号35）、リバープライマー：5'-TTAGTAGATGCCATCGTAAGCCTTTT-3'（配列番号36）を作成し、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシーケンスを実施した。その結果、配列番号18で示される1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の塩基配列を決定した。

【0104】

（実施例4）グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子遺伝子の取得

フォワードプライマー：5'-ATGGCAACTGAAAAAGTAATTGGTGTGATATT-3'（配列番号37）、リバープライマー：5'-TCACCTGTTTGCCATTTCTTAAAGGGATT-3'（配列番号38）を作成し、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシーケンスを実施した。配列番号20で示されるグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子、並びに配列番号24で示されるグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のsmallサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

【0105】

また、フォワードプライマー：5'-ATGGCAACTGAAAAAGTAATTGGTGTG-3'（配列番号39）、リバープライマー：5'-TCACCTGTTTACCATTTCTTAAAGG-3'（配列番号40）を作成し、*Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシーケンスを実施した。その結果、配列番号22で示されるグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子、並びに配列番号26で示されるグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のsmallサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

【0106】

（実施例5）プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の取得

フォワードプライマー：5'-ATGCAGATTAATGATATTGAAAGTGCTGTA-3'（配列番号47）、リバープライマー：5'-TTAATACCAGTTACGTACTGAGAATCC-3'（配列番号48）を作成し、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシーケンスを実施した。配列番号42で示されるプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

【0107】

（実施例6）プロピオン酸キナーゼ遺伝子の取得

フォワードプライマー：5'-TTGATGTCAAAAAAATACTTGCAATTAATTCTG-3'（配列番号49）、リバープライマー：5'-TTATTGCTGAGTTACATTACATCAC-3'（配列番号50）を作成し、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシーケンスを実施した。配列番号44で示されるプロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

【0108】

（実施例7）1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸の製造

(1) 組み換え微生物の作成

5'-ATGGACCGCATTATTCAATCACCGGGTAAATACATCCAGGGCGCTGATGTGATTAATCGTTAACC-3'（プライマー1：配列番号71）をN末側に付加し、配列5'-CTGGGCGAATACCTGAAGCCGCTGGCAGAACGCTGGTTAGTGGTGGGTGACAAATTTG-3'（プライマー2：配列番号72）を付加したアンピシリン耐性遺伝子（配列番号73）5μgと*E. coli* TOP10エレクトロコンピテントセル50μl

の混合液を、Bio-Rad社製 Gene-Pulser IIを用いて、0.1 cmキューベットに移した。

【0109】

Gene-Pulser IIを2.0 kV、25 mF、200Ωにセットし、電気パルスを印加した。印加後の混合液をSOC培地250μlに加え、37℃で1h培養したのち、50μg/mlのアンピシリンを含むLB培地の寒天プレートに塗布し、アンピシリン耐性株の選抜を行なった。アンピシリン耐性株の中からプライマー1とプライマー2を用いたコロニーPCRにより約2300bpの断片の増幅が認められた株をグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子ノックアウト菌株とした。

【0110】

Klebsiella oxytoca ATCC8724のゲノム1μgを制限酵素Sau3AIIUで37℃で10分間処理したサンプルを電気泳動で分離し、25~35kb周辺のDNAを回収・精製した。これを日本ジーン社製Charomid9-20ベクターにライゲーションして日本ジーン社製Lambda INNでパッケージングし、グリセロールデヒドロゲナーゼをノックアウトした*E. coli* TOP10に感染させて形質転換した。この形質転換体の中から、プローブとして、どの属のpduオペロンにおいてもオペロンの先頭部分にあるpocRのORF中の保存領域であるプローブ1（配列番号74）、どの属のpduオペロンにおいてもオペロンの後半部分にあるpduVのORF中の保存領域であるプローブ2（配列番号75）を選択し、コロニーハイブリダイゼーションを行い2つとも陽性だった菌株を選抜した。

【0111】

(2) 組み換え微生物の培養

この菌株1μlループ1掻き分を、クロラムフェニコール100μg/ml、アンピシリン50μg/mlを含む2培地5ml（グリセロール40g/l、硫酸アンモニウム10g/l、KH₂PO₄ 2g/l、K₂HPO₄ 6g/l、酵母エキス40g/l、硫酸マグネシウム七水和物1g/l、消泡剤アデカノール20滴/l）で、37℃にて振とうしながら好気条件で、対数増殖後期（OD₆₆₀=50）まで培養した。この培養液1mlをとり、再度500ml坂口フラスコに入れたクロラムフェニコール100μg/ml、アンピシリン50μg/mlを含む2培地100mlに植え継ぎ、37℃にて振とうしながら好気条件で、対数増殖後期（OD₆₆₀=50）まで培養した。

【0112】

ここでIPTGを1mMとなるように投入し、2時間おいた。菌体を遠心分離で回収し、1Mのグリセロール200mMに加え、気相部を窒素に置換した100mlボトルをボトルローラー上に37℃で5時間おき、その後、液を分析した。その結果、液中には1, 3-プロパンジオールが25mM、3-ヒドロキシプロピオン酸が21mM含まれていた。

【0113】

（実施例8）

グリセロールデヒドロゲナーゼの遺伝子を破壊するため、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子の配列（配列番号45）を解析し、開始コドンから830bp付近のKpnIサイトを選択し制限酵素サイトに破壊導入確認用の薬剤耐性マーカーを導入した。

【0114】

1) *Lactobacillus reuteri* JCM1112株のグリセロールデヒドロゲナーゼの取得とpCR4-TOP0ベクターへの導入

ゲノム情報を元に以下のように、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子部分増幅用プライマーを作成した。

フォワードプライマー: 5'-ATGGTTGAAGAATTTGGCTCACC-3'（配列番号51）

リバープライマー: 5'-TTACATACGACTATGGTGACAACG-3'（配列番号52）

PCRによる増幅の結果、目的の1112bpの断片が作成できたので、これを3'Aオーバーハング処理して更に精製し、インビトロジェンTOP0 TAクローニングkitを用いたTAクローニングを行い、TOP10セルへと形質転換した。pCR4-TOP0ベクターのTAクローニングサイトに*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子部が導入されたプラスミドを持つ形質転換体からプラスミド（pCR4-TOP0/Lb-GDH）を回収した。

【0115】

2) 薬剤耐性マーカー遺伝子の作成と制限酵素処理

既にインターネット上に公開されてるpLL253プラスミドの配列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=277339>参照) を解析し、乳酸菌で薬剤耐性マーカーとして使用可能なエリスロマイシン耐性遺伝子とそのプロモーター、ターミネーター領域が含まれかつ両末端にKpnIサイトが存在するように配列番号46で表されるDNA断片を合成した。このDNA断片を以下の表1の組成で37℃、2時間、制限酵素処理を行い、精製回収し薬剤耐性マーカー配列とした。

【0116】

【表1】

10× BufferL	10 μ l
合成した DNA 配列 (DNA 量 1 μ g)	30 μ l
KpnI	10 μ l
精製水	50 μ l
計	100 μ l

【0117】

3) 破壊導入断片の作成

a) 直線化pCR4-TOPO/Lb-GDHの作成

以下の表2の組成で、37℃にて2時間制限酵素処理を行い、約4986bpの直線化プラスミドを回収した。

【0118】

【表2】

10× BufferL	10 μ l
PCR4-TOPO / Lb_ GDH	50 μ l
KpnI	10 μ l
精製水	30 μ l
計	100 μ l

【0119】

続いて以下の表3の組成で、この直線化pCR4-TOPO/Lb-GDHを37℃で1.5時間アルカリフォスファターゼ処理し、精製回収した。回収された直線化pCR4-TOPO/Lb-GDHの濃度は30ng/ μ lであった。

【0120】

【表3】

10× BAP Buffer	10 μ l
制限酵素処理済み pCR4-TOPO /Lb GDH	50 μ l
BAP (2.5U)	10 μ l
精製水	30 μ l
計	100 μ l

【0121】

b) 破壊導入断片を挿入配列として持つpCR-4/TOPOベクターの作成

a) で作成した直線化プラスミドと2) で作成した薬剤耐性マーカー配列を、ライゲーション反応を行って連結し、E. coli TOP10セルに形質転換した。形質転換体の中から破壊導入断片を挿入配列として持つpCR4-TOP0プラスミド(hakai/ pCR4-TOP0)を選抜し、回収した。

【0122】

c) 破壊導入断片の作成

b) で作成したhakai/ pCR4-TOP0をテンプレートに1) で使用したプライマーである

フォワードプライマー: 5'-ATGGTTGAAGAATTTGGCTCACC-3' (配列番号51)

リバープライマー: 5'-TTACATACGACTATGGTGACAACG-3' (配列番号52)

を用いてPCRを行なったところ、2144bpの目的断片が増幅された。この断片を大量に精製及び濃縮し、平均5 µg/µlの濃度に調製し、遺伝子破壊導入実験に用いた。

【0123】

4) 遺伝子破壊の導入

a) コンピテントセルの作成

以下の手順でコンピテントセルを作成した。

1. MRS培地10 ml×5に、終夜培養したL. reuteri菌液 各100mlを植菌し、OD₆₀₀≒0.8まで培養した(試験管で培養を行った。ガスバックを使用した嫌気培養で約5~5.5 h)。
2. 培養液×5本を50 mlファルコンチューブに移し、集菌後、滅菌蒸留水(室温) 30~40 mlで3回洗浄した。
3. 滅菌蒸留水(室温) 800 mlで懸濁後、1.5 mlマイクロチューブに移し、集菌した。
4. 上清を廃棄後、30 % (wt/vol) PEG1500(dH₂O) 250 mlで懸濁した。
5. 100 mlずつ分注し、-80℃で保存した。
6. 使用直前に溶解し、エレクトロポレーションに供した。

【0124】

b) コンピテントセルへの破壊断片の導入

1. 供試プラスミド(5~10 ml ; 2~3 mg)を前記手法で作成したコンピテントセルに添加した。
2. 予め冷却しておいた0.2 cmキューベットに混合液を移した。
3. Gene pulserを2.5 kV, 25 mF, 200 Ωにセットし、電気パルスを印加した。
4. すぐに、予め37℃で保温しておいたMRS brothをtotal 1 mlになるように添加し、37℃で1.5~2 hインキュベートした。
5. MRS agar containing erythromycin (2 mg/ml)に塗抹し、37℃で24~48 h嫌気培養した(ガスバックで嫌気培養を行った)。

【0125】

c) 破壊導入株の選抜

b) の培養の結果生育してきたエリスロマイシン耐性株を選抜し、ゲノムを回収した。そのゲノムをテンプレートにPCRにてインサートの確認を行なった。薬剤耐性という形質と、ゲノム上での遺伝子の導入がPCRにて確認できた株を破壊導入株とした。

5) 破壊株を用いた反応

【0126】

通常のMRS培地に2%グリセリンが入った培地10mlに終夜培養した破壊株の培養液100 µlを加え、37℃で24h嫌気条件下で培養する。この菌体を2500×gで10分遠心分離して回収後、pH7.5の50mMカリウムリン酸バッファ10mlで2回洗浄後、グリセリン2%を含むpH7.5の50mMカリウムリン酸バッファ10mlを入れ37℃で反応させた。反応実績は、以下のとおりである。比較例として破壊導入していない乳酸菌を用いた。結果を以下の表4に示す。

【0127】

【表 4】

破壊株の反応成績

反応時間(h)	0	24	48	72	96	120
グリセロール(mM)	200	140	100	50	25	0
1,3-プロパンジオール(mM)	0	29	48	72	85	95
3-ヒドロキシプロピオン酸(mM)	0	27	47	70	83	94

野生株の反応成績

反応時間(h)	0	24	48	72	96	120
グリセロール(mM)	200	180	181	180	180	180
1,3-プロパンジオール(mM)	0	10	9	10	9	12
3-ヒドロキシプロピオン酸(mM)	0	0	0	0	0	0

【0128】

以上から、本発明により、グリセロールから1, 3-プロパンジオールを製造する際の原料グリセロールのロスを低減し、かつ1, 3-プロパンジオールと合わせて3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することができることが明らかとなった。

【0129】

(実施例9) ホスホトランスアシラーゼ活性の確認

対数増殖後期の菌体(Lactobacillus reuteri JCM1112株) ブロス10mlをpH8の50mMカリウムリン酸バッファ10mlで2回洗浄し、pH8の50mMカリウムリン酸バッファ10mlに再懸濁させ、氷冷しながら超音波にて菌体を破碎する。20,000×gで30分遠心し、上清を粗酵素液とした。この粗酵素液を適当に希釈し、アセチルCoAを加えたpH7.5のバッファに加え、37℃で反応させ、CoAの生成を定量した。その結果、CoAの生成が確認された。

また、Lactobacillus reuteri JCM1112株をゲノム解析した結果、ホスホトランスアシラーゼと相同性を持つorfが確認された。

【図面の簡単な説明】

【0130】

【図1】 pdu オペロンの構造を示す。

【図2】 グリセロールから1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸が生成される機構の一態様を示す。

【配列表フリーテキスト】

【0131】

配列番号27～40、46～52：合成オリゴヌクレオチド

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NIPPON SHOKUBAI CO., LTD.

<120> Method for producing 1,3-propanediol and 3-hydroxypropionic acid

<130> P04-0356

<160> 75

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 558

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 1

Met	Lys	Arg	Gln	Lys	Arg	Phe	Glu	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Pro	Ile	His
1				5					10					15	

Gln	Asp	Thr	Phe	Val	Lys	Glu	Trp	Pro	Glu	Glu	Gly	Phe	Val	Ala	Met
			20					25					30		

Met	Gly	Pro	Asn	Asp	Pro	Lys	Pro	Ser	Val	Lys	Val	Glu	Asn	Gly	Lys
		35					40					45			

Ile	Val	Glu	Met	Asp	Gly	Lys	Lys	Leu	Glu	Asp	Phe	Asp	Leu	Ile	Asp
	50					55					60				

Leu	Tyr	Ile	Ala	Lys	Tyr	Gly	Ile	Asn	Ile	Asp	Asn	Val	Glu	Lys	Val
65					70					75					80

Met	Asn	Met	Asp	Ser	Thr	Lys	Ile	Ala	Arg	Met	Leu	Val	Asp	Pro	Asn
				85					90					95	

Val	Ser	Arg	Asp	Glu	Ile	Ile	Glu	Ile	Thr	Ser	Ala	Leu	Thr	Pro	Ala
			100					105					110		

Lys	Ala	Glu	Glu	Ile	Ile	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Gly	Glu	Met	Ile	Met
		115					120					125			

Ala	Val	Lys	Lys	Met	Arg	Pro	Arg	Arg	Lys	Pro	Asp	Asn	Gln	Cys	His	
	130					135					140					
Val	Thr	Asn	Thr	Val	Asp	Asn	Pro	Val	Gln	Ile	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	
145					150					155						160
Asp	Ala	Ala	Leu	Arg	Gly	Phe	Pro	Glu	Gln	Glu	Thr	Thr	Thr	Ala	Val	
				165					170						175	
Ala	Arg	Tyr	Ala	Pro	Phe	Asn	Ala	Ile	Ser	Ile	Leu	Ile	Gly	Ala	Gln	
			180					185						190		
Thr	Gly	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Thr	Gln	Cys	Ser	Val	Glu	Glu	Ala	Thr	
		195					200						205			
Glu	Leu	Gln	Leu	Gly	Met	Arg	Gly	Phe	Thr	Ala	Tyr	Ala	Glu	Thr	Ile	
	210					215					220					
Ser	Val	Tyr	Gly	Thr	Asp	Arg	Val	Phe	Thr	Asp	Gly	Asp	Asp	Thr	Pro	
225					230					235					240	
Trp	Ser	Lys	Gly	Phe	Leu	Ala	Ser	Cys	Tyr	Ala	Ser	Arg	Gly	Leu	Lys	
				245					250					255		
Met	Arg	Phe	Thr	Ser	Gly	Ala	Gly	Ser	Glu	Val	Leu	Met	Gly	Tyr	Pro	
			260					265					270			
Glu	Gly	Lys	Ser	Met	Leu	Tyr	Leu	Glu	Ala	Arg	Cys	Ile	Leu	Leu	Thr	
		275					280					285				
Lys	Ala	Ser	Gly	Val	Gln	Gly	Leu	Gln	Asn	Gly	Ala	Val	Ser	Cys	Ile	
	290					295					300					
Glu	Ile	Pro	Gly	Ala	Val	Pro	Asn	Gly	Ile	Arg	Glu	Val	Leu	Gly	Glu	
305					310					315					320	

Asn Leu Leu Cys Met Met Cys Asp Ile Glu Cys Ala Ser Gly Cys Asp
325 330 335

Gln Ala Tyr Ser His Ser Asp Met Arg Arg Thr Glu Arg Phe Ile Gly
340 345 350

Gln Phe Ile Ala Gly Thr Asp Tyr Ile Asn Ser Gly Tyr Ser Ser Thr
355 360 365

Pro Asn Tyr Asp Asn Thr Phe Ala Gly Ser Asn Thr Asp Ala Met Asp
370 375 380

Tyr Asp Asp Met Tyr Val Met Glu Arg Asp Leu Gly Gln Tyr Tyr Gly
385 390 395 400

Ile His Pro Val Lys Glu Glu Thr Ile Ile Lys Ala Arg Asn Lys Ala
405 410 415

Ala Lys Ala Leu Gln Ala Val Phe Glu Asp Leu Gly Leu Pro Lys Ile
420 425 430

Thr Asp Glu Glu Val Glu Ala Ala Thr Tyr Ala Asn Thr His Asp Asp
435 440 445

Met Pro Lys Arg Asp Met Val Ala Asp Met Lys Ala Ala Gln Asp Met
450 455 460

Met Asp Arg Gly Ile Thr Ala Ile Asp Ile Ile Lys Ala Leu Tyr Asn
465 470 475 480

His Gly Phe Lys Asp Val Ala Glu Ala Ile Leu Asn Leu Gln Lys Gln
485 490 495

Lys Val Val Gly Asp Tyr Leu Gln Thr Ser Ser Ile Phe Asp Lys Asp
500 505 510

Trp Asn Val Thr Ser Ala Val Asn Asp Gly Asn Asp Tyr Gln Gly Pro
515 520 525

Gly Thr Gly Tyr Arg Leu Tyr Glu Asp Lys Glu Glu Trp Asp Arg Ile
530 535 540

Lys Asp Leu Pro Phe Ala Leu Asp Pro Glu His Leu Glu Leu
545 550 555

<210> 2
<211> 1677
<212> DNA
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 2
atgaaacgtc aaaaacgatt tgaagaacta gaaaaacggc caattcatca agatacattt 60
gttaaagaat ggccagaaga aggtttcgtt gcaatgatgg ggccctaatga ccctaagcct 120
agtgtaaaag ttgaaaatgg caagatcgta gagatggatg gtaaaaagct cgaagatttt 180
gatttgattg acttgtagat tgctaagtat ggaatcaata ttgacaacgt tgaaaaagtt 240
atgaatatgg attctaccaa gattgcacgg atgcttggtg atcctaattgt ttctcgtgat 300
gaaattattg aaattacatc agctttgact cctgctaagg ctgaagagat catcagtaag 360
cttgattttg gtgaaatgat tatggctgtc aagaagatgc gcccacgtcg taagcctgac 420
aaccagtgtc acgttaccaa tactgttgat aaccagttc aaattgctgc tgatgctgct 480
gatgccgctc ttcgtggatt tccagaacaa gaaaccacga cagctgtggc acgttatgca 540
ccattcaatg ctatttcaat tttaatgggt gcacaaacag gtcgccctgg tgtattgaca 600
caatgttctg ttgaagaagc tactgaattg caattaggta tgcgtgggtt taccgcatat 660
gctgaaacca tttcagttta cgggtactgat cgtgtattta ccgatgggtga tgatactcca 720
tgggtctaaag gcttcttggc atcttggttat gcatcacgtg gtttgaagat gcgatttact 780
tcagggtgccg gttcagaagt ttgatgggt tatccagaag gtaagtcaat gctttacctt 840
gaagcgcgtt gtattttact tactaaggct tcagggtgtc aaggacttca aaatgggtgcc 900
gtaagttgta ttgaaattcc tgggtgctgtt cctaattggt ttcgtgaagt tctcggtgaa 960
aacttggttat gtatgatgtg tgacatcgaa tgtgcttctg gttgtgacca agcatactca 1020

```

cactccgata tgcggcggac tgaacgggtt attggtcaat ttattgccgg tactgattat 1080
attaactctg gttactcatc aactcctaac tacgataata ccttcgctgg ttcaaacact 1140
gatgctatgg actacgatga tatgtatgtt atggaacgtg acttgggtca atattatggt 1200
attcaccctg ttaaggaaga aaccattatt aaggcacgta ataaggccgc taaagccctt 1260
caagcagtat ttgaagatct tggattacca aagattactg atgaagaggc cgaagcagca 1320
acgtatgcta acacccatga tgacatgcca aagcgggata tggttgcaga tatgaaggct 1380
gctcaagata tgatggatcg tggaaattact gctattgata ttatcaaggc attgtacaac 1440
cacggattta aagatgtcgc tgaagcaatt ttgaaccttc aaaaacaaaa agttgttggt 1500
gattaccttc aaacatcttc ttttttgat aaagattgga acgtcacttc tgctgttaac 1560
gacggaaatg attatcaagg accaggtact ggataccgtc tataatgaaga caaggaagaa 1620
tgggatcggg ttaaagactt accattcgcc cttgatccag aacatttgga actgtag 1677

```

```

<210> 3
<211> 558
<212> PRT
<213> Lactobacillus reuteri

```

```

<400> 3

```

```

Met Lys Arg Gln Lys Arg Phe Glu Glu Leu Glu Lys Arg Pro Ile His
1          5          10          15

```

```

Gln Asp Thr Phe Val Lys Glu Trp Pro Glu Glu Gly Phe Val Ala Met
          20          25          30

```

```

Met Gly Pro Asn Asp Pro Lys Pro Ser Val Lys Val Glu Asn Gly Lys
          35          40          45

```

```

Ile Val Glu Met Asp Gly Lys Lys Arg Glu Asp Phe Asp Leu Ile Asp
          50          55          60

```

```

Leu Tyr Ile Ala Lys Tyr Gly Ile Asn Ile Asp Asn Val Glu Lys Val
65          70          75          80

```

Met Asn Met Asp Ser Thr Lys Ile Ala Arg Met Leu Val Asp Pro Asn
85 90 95

Val Ser Arg Glu Ser Ile Ile Glu Ile Thr Ser Ala Leu Thr Pro Ala
100 105 110

Lys Ala Glu Glu Ile Ile Ser Lys Leu Asp Phe Gly Glu Met Ile Met
115 120 125

Ala Ile Lys Lys Met Arg Pro Arg Arg Lys Pro Asp Asn Gln Cys His
130 135 140

Val Thr Asn Thr Val Asp Asn Pro Val Gln Ile Ala Ala Asp Ala Ala
145 150 155 160

Asp Ala Ala Leu Arg Gly Phe Pro Glu Gln Glu Thr Thr Thr Ala Val
165 170 175

Ala Arg Tyr Ala Pro Phe Asn Ala Ile Ser Ile Leu Ile Gly Ala Gln
180 185 190

Thr Gly Arg Pro Gly Val Leu Thr Gln Cys Ser Val Glu Glu Ala Thr
195 200 205

Glu Leu Gln Leu Gly Met Arg Gly Phe Thr Ala Tyr Ala Glu Thr Ile
210 215 220

Ser Val Tyr Gly Thr Asp Arg Val Phe Thr Asp Gly Asp Asp Thr Pro
225 230 235 240

Trp Ser Lys Gly Phe Leu Ala Ser Cys Tyr Ala Ser Arg Gly Leu Lys
245 250 255

Met Arg Phe Thr Ser Gly Ala Gly Ser Glu Val Leu Met Gly Tyr Pro
260 265 270

Glu Gly Lys Ser Met Leu Tyr Leu Glu Ala Arg Cys Ile Leu Leu Thr
275 280 285

Lys Ala Ser Gly Val Gln Gly Leu Gln Asn Gly Ala Val Ser Cys Ile
290 295 300

Glu Ile Pro Gly Ala Val Pro Asn Gly Ile Arg Glu Val Leu Gly Glu
305 310 315 320

Asn Leu Leu Cys Met Met Cys Asp Ile Glu Cys Ala Ser Gly Cys Asp
325 330 335

Gln Ala Tyr Ser His Ser Asp Met Arg Arg Thr Glu Arg Phe Ile Gly
340 345 350

Gln Phe Ile Ala Gly Thr Asp Tyr Ile Asn Ser Gly Tyr Ser Ser Thr
355 360 365

Pro Asn Tyr Asp Asn Thr Phe Ala Gly Ser Asn Thr Asp Ala Met Asp
370 375 380

Tyr Asp Asp Met Tyr Val Met Glu Arg Asp Leu Gly Gln Tyr Tyr Gly
385 390 395 400

Ile His Pro Val Gln Glu Glu Thr Ile Ile Lys Ala Arg Asn Lys Ala
405 410 415

Ala Lys Ala Leu Gln Ala Val Phe Glu Asp Leu Gly Leu Pro Lys Ile
420 425 430

Thr Asp Glu Glu Val Glu Ala Ala Thr Tyr Ala Asn Thr His Asp Asp
435 440 445

Met Pro Lys Arg Asp Met Val Ala Asp Met Lys Ala Ala Gln Asp Met
450 455 460

Met Asp Arg Gly Ile Thr Ala Ile Asp Ile Ile Lys Ala Leu Tyr Asn
465 470 475 480

His Gly Phe Lys Asp Val Ala Glu Ala Val Leu Asn Leu Gln Lys Gln
485 490 495

Lys Val Val Gly Asp Tyr Leu Gln Thr Ser Ser Ile Phe Asp Lys Asp
500 505 510

Trp Asn Ile Thr Ser Ala Val Asn Asp Gly Asn Asp Tyr Gln Gly Pro
515 520 525

Gly Thr Gly Tyr Arg Leu Tyr Glu Asp Lys Glu Glu Trp Asp Arg Ile
530 535 540

Lys Asp Leu Pro Phe Ala Leu Asp Pro Glu His Leu Glu Leu
545 550 555

<210> 4
<211> 1677
<212> DNA
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 4
atgaaacgtc aaaaacgttt tgaagaacta gaaaagcggc caattcatca agatacatTT 60
gttaaggaat ggcctgaaga aggtttcgtt gcaatgatgg gtccaaatga cccgaagcca 120
agtgtaaagg ttgaaaacgg taaaattgtc gaaatggatg gcaagaagcg ggaagacttt 180
gacttaattg acctctacat tgctaagtat ggaattaata ttgataacgt tgaaaaagtt 240
atgaatatgg attcaactaa aattgcacgg atgttggttg atccaaatgt ctcacgtgaa 300
tccatcattg aaattacttc tgcactaact ccagcgaag ccgaagaaat cattagtaag 360
cttgactttg gtgaaatgat tatggctatc aagaagatgc gtccgcgtcg gaagccggat 420
aaccaatgtc acgttaccaa cacggttgat aaccagttc aaattgctgc tgatgctgct 480
gatgctgcgc ttcgtggttt ccagaacaa gaaactacta ctgccgttgc cgttatgca 540
ccatttaatg ctatttcaat ctttaattggg gctcaaacag gtcgtcctgg tgtattaaca 600
caatgttctg ttgaagaagc aaccgaattg caattaggaa tgcgtggctt taccgcttat 660
gctgaaacta tttcagttta tgg tactgac cgggtattta ctgatggtga tgatacacca 720

tggtctaaag gattccttgc atcatgttat gcatcgcgtg gtttgaagat gcggtttact	780
tcagggtgctg gttcagaagt ttatgatgggt taccacagaag gtaagtcaat gttatatctt	840
gaagcacggtt gtattttact taccaaggct tcagggtgttc aaggacttca aaacgggtgcc	900
gtaagttgta ttgaaattcc aggtgctgtt cctaacggta tccgtgaagt tcttggtgaa	960
aacctattat gtatgatgtg tgatattgaa tgtgcttctg gttgtgacca agcatactca	1020
cactcagata tgcggcgctac tgaacgggtt atttggtcaat ttattgccgg tactgattac	1080
attaattctg gttactcatc aactcctaac tacgataaca cctttgctgg ttcaaacacc	1140
gatgcaatgg actacgatga catgtatgtt atggaacgtg acttaggtca atactatggt	1200
attcaccag ttcaagaaga aacaattatt aaggctcgta acaaggctgc taaggcatta	1260
caagctgtat ttgaagatct tggactacct aagattactg atgaagaagt tgaagctgct	1320
acatatgcta acactcatga tgacatgcca aaacgtgaca tggttgcaga tatgaaagcc	1380
gctcaagata tgatggatcg tggcattact gctattgata ttattaaggc tctttataac	1440
catggattta aggatgttgc tgaagctgta ttgaaccttc aaaagcaaaa ggttgtcggt	1500
gattaccttc aaacttcac aatctttgac aaggattgga atatcacttc tgccgtaaat	1560
gacgggaatg actaccaagg tccaggctact ggataccgtc tataatgaaga caaggaagaa	1620
tgggatcgaa tcaaagatct tccattcgca cttgatccag aacacttgga actatag	1677

<210> 5
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus reuteri

<400> 5

Met	Ala	Asp	Ile	Asp	Glu	Asn	Leu	Leu	Arg	Lys	Ile	Val	Lys	Glu	Val
1				5					10					15	

Leu	Ser	Glu	Thr	Asn	Gln	Ile	Asp	Thr	Lys	Ile	Asp	Phe	Asp	Lys	Ser
			20					25					30		

Asn	Asp	Ser	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Gln	Glu	Val	Gln	Gln	Pro	Asn	Ser
		35					40					45			

Gly Lys Pro Glu Glu Glu Ile Lys Val Thr Phe Asp
225 230 235

<210> 6
<211> 711
<212> DNA
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 6
atggctgata ttgatgaaaa cttattacgt aaaatcgta aagaagtttt aagcgaaact 60
aatcaaatcg atactaagat tgactttgat aaaagtaatg atagtactgc aacagcaact 120
caagagggtgc aacaaccaaaa tagtaaagct gttccagaaa agaaacttga ctggttccaa 180
ccagttggag aagcaaaaacc tggatatctt aaggatgaag ttgtaattgc agtcggtcct 240
gcattcgcaa ctgttcttga taagacagaa actgggtattc ctcataaaga agtgcttcgt 300
caagttattg ctgggtattga agaagaaggg ctttaaggcgc gggtagttaa agtttaccgg 360
agttcagatg tagcattctg tgctgtccaa ggtgatacc tttctgggtc aggaattgct 420
attggtatcc aatcaaaaagg gacgacagtt attcaccaaa aggatcaaga ccctcttggt 480
aaccttgagt tattcccaaa agcgccagta cttactcccg aaacttatcg tgcaattggt 540
aagaatgccg ctatgtatgc taaggggtgaa tctccagAAC cagttccagc taaaaacgat 600
caacttgctc gtattcacta tcaagctatt tcagcaatta tgcataattcg tgaaactcac 660
caagttgttg ttggtaagcc tgaagaagaa attaaggtta cgtttgatta a 711

<210> 7
<211> 236
<212> PRT
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 7

Met Ala Asp Ile Asp Glu Asn Leu Leu Arg Lys Ile Val Lys Glu Val
1 5 10 15

Leu Asn Glu Thr Asn Gln Ile Asp Thr Lys Ile Asn Phe Asp Lys Glu
20 25 30

Asn Asn Ser Thr Ala Thr Ala Thr Glu Glu Val Gln Gln Pro Asn Ser
35 40 45

Lys Ala Val Pro Glu Lys Lys Leu Asp Trp Phe Gln Pro Ile Gly Glu
50 55 60

Ala Lys Pro Gly Tyr Ser Lys Asp Glu Val Val Ile Ala Val Gly Pro
65 70 75 80

Ala Phe Ala Thr Val Leu Asp Lys Thr Glu Thr Gly Ile Pro His Lys
85 90 95

Glu Val Leu Arg Gln Val Ile Ala Gly Ile Glu Glu Glu Gly Leu Lys
100 105 110

Ala Arg Val Val Lys Val Tyr Arg Ser Ser Asp Val Ala Phe Cys Ala
115 120 125

Val Gln Gly Asp His Leu Ser Gly Ser Gly Ile Ala Ile Gly Ile Gln
130 135 140

Ser Lys Gly Thr Thr Val Ile His Gln Lys Asp Gln Asp Pro Leu Gly
145 150 155 160

Asn Leu Glu Leu Phe Pro Gln Ala Pro Val Leu Thr Pro Glu Thr Phe
165 170 175

Arg Ala Ile Gly Lys Asn Ala Ala Met Tyr Ala Lys Gly Glu Ser Pro
180 185 190

Glu Pro Val Pro Ala Lys Asn Asp Gln Leu Ala Arg Ile His Tyr Gln
195 200 205

Ala Ile Ser Ala Ile Met His Ile Arg Glu Thr His Gln Val Val Val
210 215 220

Gly Lys Pro Glu Glu Glu Ile Lys Val Thr Phe Asp
225 230 235

<210> 8

<211> 711

<212> DNA
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 8
atggctgata tcgatgaaaa tttaacttcgt aagatcgta aagaagtttt aaacgagact 60
aatcaaattg atactaagat caattttgac aaggaaaata atagtaccgc aactgctact 120
gaagaagttc aacaacccaaa cagcaaggca gttcctgaaa agaaacttga ttggttccaa 180
ccaattggcg aagcaaaacc aggggtactca aaggatgaag ttgtaatcgc agttggtcct 240
gcctttgcaa cagttctaga taaaacagaa actgggattc ctcataaaga ggtacttcgt 300
caagtaattg ccggaattga agaagaggga cttaaagcac gagtagttaa agtctatcgt 360
tcatcagacg ttgctttctg tgctgttcag ggtgaecact tatctggttc aggaattgca 420
attggaatcc aatctaaggg aacaactggt attcaccaaa aagaccagga tccattagga 480
aaectagaat tattcccaca agctccgggt cttacaccag aaactttccg ggcaattggg 540
aagaatgcag caatgtacgc taaagggtgaa tctccagAAC cagttccagc taagaacgat 600
caacttgctc gtattcacta ccaagctatt tcagcaatta tgcataattcg tgaaactcac 660
caagttgttg ttggaaagcc tgaagaagaa atcaaagtta cgttcgatta a 711

<210> 9
<211> 172
<212> PRT
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 9

Met Met Ser Glu Val Asp Asp Leu Val Ala Lys Ile Met Ala Gln Met
1 5 10 15

Gly Asn Ser Ser Ser Ala Asn Ser Ser Thr Gly Thr Ser Thr Ala Ser
20 25 30

Thr Ser Lys Glu Met Thr Ala Asp Asp Tyr Pro Leu Tyr Gln Lys His
35 40 45

Arg Asp Leu Val Lys Thr Pro Lys Gly His Asn Leu Asp Asp Ile Asn
50 55 60

Leu Gln Lys Val Val Asn Asn Gln Val Asp Pro Lys Glu Leu Arg Ile
65 70 75 80

Thr Pro Glu Ala Leu Lys Leu Gln Gly Glu Ile Ala Ala Asn Ala Gly
85 90 95

Arg Pro Ala Ile Gln Lys Asn Leu Gln Arg Ala Ala Glu Leu Thr Arg
100 105 110

Val Pro Asp Glu Arg Val Leu Glu Met Tyr Asp Ala Leu Arg Pro Phe
115 120 125

Arg Ser Thr Lys Gln Glu Leu Leu Asn Ile Ala Lys Glu Leu Arg Asp
130 135 140

Lys Tyr Asp Ala Asn Val Cys Ala Ala Trp Phe Glu Glu Ala Ala Asp
145 150 155 160

Tyr Tyr Glu Ser Arg Lys Lys Leu Lys Gly Asp Asn
165 170

<210> 10
<211> 519
<212> DNA
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 10
atgatgagtg aagttgatga tttagtagca aagatcatgg ctcagatggg aaacagttca 60
tctgctaata gctctacagg tacttcaact gcaagtacta gtaaggaaat gacagcagat 120
gattaccacac tttatcaaaa gcaccgtgat ttagtaaaaa caccaaaagg acacaatctt 180
gatgacatca atttacaaaa agtagtaaat aatcaagttg atcctaagga attacggatt 240
acaccagaag cattgaaact tcaagggtgaa attgcagcta atgctggccg tccagctatt 300
caaaagaatc ttcaacgagc tgcagaatta acacgagtac ctgacgaacg ggttcttgaa 360
atgtatgatg cattgcgtcc tttccgttca actaagcaag aattattgaa cattgcaaag 420

gaattacggg acaagtatga cgctaattgtt tgcgcagcat ggtttgaaga agctgctgat 480

tattatgaaa gtcgtaagaa gctaaagggc gataactaa 519

<210> 11

<211> 171

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 11

Met Ser Glu Val Asp Asp Leu Val Ala Lys Ile Met Ala Gln Met Gly
1 5 10 15

Asn Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Ser Ala Thr Ser Thr Asn Asn
20 25 30

Gly Lys Glu Met Thr Ala Asp Asp Tyr Pro Leu Tyr Gln Lys His Arg
35 40 45

Asp Leu Val Lys Thr Pro Ser Gly Lys Lys Leu Asp Asp Ile Thr Leu
50 55 60

Gln Lys Val Val Asn Asp Gln Val Asp Pro Lys Glu Leu Arg Ile Thr
65 70 75 80

Pro Glu Ala Leu Lys Leu Gln Gly Glu Ile Ala Ala Asn Ala Gly Arg
85 90 95

Pro Ala Ile Gln Lys Asn Leu Gln Arg Ala Ala Glu Leu Thr Arg Val
100 105 110

Pro Asp Glu Arg Val Leu Gln Met Tyr Asp Ala Leu Arg Pro Phe Arg
115 120 125

Ser Thr Lys Gln Glu Leu Leu Asp Ile Ala Asn Glu Leu Arg Asp Lys
130 135 140

Tyr His Ala Glu Val Cys Ala Ala Trp Phe Glu Glu Ala Ala Asn Tyr
145 150 155 160

Tyr Glu Ser Arg Lys Lys Leu Lys Gly Asp Asn
165 170

<210> 12
<211> 516
<212> DNA
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 12
atgagtgaag ttgatgattt agtagcaaag atcatggcac agatgggaaa tagctcatct 60
tccgatagtt caacaagtgc tacttcaaca aataacggta aggaaatgac agcagatgac 120
tatectcttt accaaaagca ccgtgattta gtaaagacac cateaggaaa gaaacttgat 180
gatattactt tacaaaaggt tgtaaatgat caagttgac caaaagaatt acggattact 240
ccagaagcat taaaacttca aggtgagatc gcagcaaacg ctggtcggcc agcaattcaa 300
aagaacttac aacgggcagc tgaattaaca cgtgttcag acgaacgtgt tttgcaaattg 360
tatgatgcat tacggccatt ccgttcaacg aagcaagaat tactagatat tgctaattgaa 420
ctccgtgata aatatcatgc agaagtatgt gcagcttggf ttgaagaagc tgcaaattac 480
tatgaaagtc gaaagaagct caagggatgat aactag 516

<210> 13
<211> 379
<212> PRT
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 13

Met Gly Gly Ile Ile Pro Met Glu Lys Tyr Ser Met Pro Thr Arg Ile
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Thr Asp Ser Leu Lys Glu Leu Glu Thr Leu Asn Asn Glu
20 25 30

Arg Ile Leu Leu Val Cys Asp Ser Phe Leu Pro Gly Ser Asp Thr Leu
35 40 45

Lys Glu Ile Glu Ser His Ile Lys Asp Asn Asn Lys Cys Glu Ile Phe
50 55 60

Ser Asp Val Val Pro Asp Pro Pro Leu Asp Lys Ile Met Glu Gly Val
65 70 75 80

Gln Gln Phe Leu Lys Leu Lys Pro Thr Ile Val Ile Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Gly Ser Ala Leu Asp Thr Gly Lys Gly Ile Arg Phe Phe Gly Glu Lys
100 105 110

Leu Gly Lys Cys Lys Ile Asn Glu Tyr Ile Ala Ile Pro Thr Thr Ser
115 120 125

Gly Thr Gly Ser Glu Val Thr Asn Thr Ala Val Ile Ser Asp Thr Lys
130 135 140

Glu His Arg Lys Ile Pro Ile Leu Glu Asp Tyr Leu Thr Pro Asp Cys
145 150 155 160

Ala Leu Leu Asp Pro Lys Leu Val Met Thr Ala Pro Lys Ser Val Thr
165 170 175

Ala Tyr Ser Gly Met Asp Val Leu Thr His Ala Leu Glu Ser Leu Val
180 185 190

Ala Lys Asp Ala Asn Leu Phe Thr Val Ala Leu Ser Glu Glu Ala Ile
195 200 205

Asp Ala Val Ile Lys His Leu Val Glu Cys Tyr Arg His Gly Asp Asn
210 215 220

Val Asp Ala Arg Lys Ile Val His Glu Ala Ser Asn Ile Ala Gly Thr
225 230 235 240

Ala Phe Asn Ile Ala Gly Leu Gly Ile Cys His Ser Ile Ala His Gln
245 250 255

Leu Gly Ala Asn Phe His Val Pro His Gly Leu Ala Asn Thr Met Leu
260 265 270

Leu Pro Tyr Val Ile Ala Tyr Asn Ala Glu His Ser Glu Glu Ala Leu
275 280 285

His Lys Phe Ala Ile Ala Ala Lys Lys Ala Gly Ile Ala Ala Pro Gly
290 295 300

Val Gly Asp Arg Leu Ala Val Lys Arg Leu Ile Ala Lys Ile Arg Glu
305 310 315 320

Met Ala Arg Gln Met Asn Cys Pro Met Thr Leu Gln Ala Phe Gly Val
325 330 335

Asp Pro Ala Lys Ala Glu Glu Leu Ala Asp Thr Val Val Ala Asn Ala
340 345 350

Lys Lys Asp Ala Thr Phe Pro Gly Asn Pro Val Val Pro Ser Asp Asn
355 360 365

Asp Leu Lys Met Val Tyr Glu Ala Ile Ile Arg
370 375

<210> 14

<211> 1140

<212> DNA

<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 14

atgggaggca taattccaat ggaaaaatat agtatgccaa cccggattta ttcgggaaca 60
gatagtttga aagaactaga gacacttaat aatgaacgta ttttattagt ctgtgattct 120
ttcttgccctg gtagtgatac cttaaaagaa attgagagtc acattaagga taataataag 180
tgtgaaattt tctctgatgt tgtecccgat cctccactag ataagattat ggaaggggtt 240
caacaattcc ttaaaacttaa accaacaatt gtgattggta tcggtggcgg atcagctttg 300

gatactggta aggggaattcg ttctcttgggt gaaaagttgg gcaagtgcaa gatcaatgaa 360
tatattgcta ttccaacaac gagtgggtact ggttcagaag ttacgaatac tgcggttatt 420
tctgatacga aagaacatcg taaaattcct attttggag attatttgac acctgattgt 480
gctttactag atcctaaact agttatgact gctcctaaga gtgtaactgc atattcagga 540
atggatgttt taacacatgc acttgaatct ttggttgcta aggatgc aaa tttattcaca 600
gttgcaattat cagaagaagc aattgatgcc gttattaaac atttagttga gtgttatcgt 660
cacggcgata atgtggatgc tcgtaagatt gttcatgaag catcaaatat tgccgggaact 720
gcatttaata ttgctggatt agggatttgc cactcaattg cgcatacaatt gggagctaata 780
ttccacgttc cccatgggttt agcaaataca atgctcttgc cataatgttat cgcataataat 840
gctgaacata gtgaagaggc attgcataag tttgcaattg ctgctaagaa agctggaatt 900
gctgctcctg gagtaggcga tcgtcttgca gtaaagcgac taattgctaa aattagggaa 960
atggcacgac aaatgaattg tccaatgact ctccaagcat tcgggtgttga tcctgctaaa 1020
gctgaagaat tagctgatac tgttgttgca aatgcgaaga aagatgc aac attccctggc 1080
aatccagttg ttccttcaga taatgatctg aagatggttt acgaagcaat aattcgttaa 1140

<210> 15
<211> 379
<212> PRT
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 15

Met	Gly	Gly	Ile	Met	Pro	Met	Glu	Lys	Phe	Ser	Met	Pro	Thr	Arg	Ile
1				5					10					15	

Tyr	Ser	Gly	Thr	Asp	Ser	Leu	Lys	Glu	Leu	Glu	Thr	Leu	His	Asn	Glu
			20					25					30		

Arg	Ile	Leu	Leu	Val	Cys	Asp	Ser	Phe	Leu	Pro	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu
		35					40					45			

Lys	Glu	Ile	Glu	Ser	His	Ile	Asn	Asp	Ser	Asn	Lys	Cys	Glu	Ile	Phe
50						55					60				

Ser	Asp	Val	Val	Pro	Asp	Pro	Pro	Leu	Asp	Lys	Ile	Met	Glu	Gly	Val	
65					70					75					80	
Gln	Gln	Phe	Leu	Lys	Leu	Lys	Pro	Thr	Ile	Val	Ile	Gly	Ile	Gly	Gly	
				85					90					95		
Gly	Ser	Ala	Met	Asp	Thr	Gly	Lys	Gly	Ile	Arg	Phe	Phe	Gly	Glu	Lys	
			100					105					110			
Leu	Gly	Lys	Cys	Lys	Ile	Asn	Glu	Tyr	Ile	Ala	Ile	Pro	Thr	Thr	Ser	
		115					120					125				
Gly	Thr	Gly	Ser	Glu	Val	Thr	Asn	Thr	Ala	Val	Ile	Ser	Asp	Thr	Lys	
	130					135					140					
Glu	His	Arg	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Asp	Tyr	Leu	Thr	Pro	Asp	Cys	
145					150					155					160	
Ala	Leu	Leu	Asp	Pro	Lys	Leu	Val	Met	Thr	Ala	Pro	Lys	Ser	Val	Thr	
				165					170					175		
Ala	Tyr	Ser	Gly	Met	Asp	Val	Leu	Thr	His	Ala	Leu	Glu	Ser	Leu	Val	
			180					185					190			
Ala	Lys	Asp	Ala	Asn	Leu	Phe	Thr	Val	Ala	Leu	Ser	Glu	Glu	Ala	Ile	
		195					200					205				
Asp	Ala	Val	Thr	Lys	Tyr	Leu	Val	Glu	Cys	Tyr	Arg	His	Gly	Asp	Asn	
	210					215					220					
Val	Asp	Ala	Arg	Lys	Ile	Val	His	Glu	Ala	Ser	Asn	Ile	Ala	Gly	Thr	
225					230					235					240	
Ala	Phe	Asn	Ile	Ala	Gly	Leu	Gly	Ile	Cys	His	Ser	Ile	Ala	His	Gln	
				245					250					255		

Leu Gly Ala Asn Phe His Val Pro His Gly Leu Ala Asn Thr Met Leu
260 265 270

Leu Pro Tyr Val Val Ala Tyr Asn Ala Glu His Cys Glu Glu Ala Leu
275 280 285

His Lys Phe Ala Ile Ala Ala Lys Lys Ala Gly Ile Ala Ala Pro Gly
290 295 300

Val Gly Asp Arg Leu Ala Val Lys Arg Leu Ile Ala Lys Ile Arg Glu
305 310 315 320

Met Ala Arg Gln Met Asn Cys Pro Met Thr Leu Gln Ala Phe Gly Val
325 330 335

Asp His Ala Lys Ala Glu Ala Ala Ala Asp Thr Val Val Ala Asn Ala
340 345 350

Lys Lys Asp Ala Thr Phe Pro Gly Asn Pro Val Val Pro Ser Asp Asp
355 360 365

Asp Leu Lys Met Ile Tyr Glu Ala Ile Ile Arg
370 375

<210> 16
<211> 1140
<212> DNA
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 16
atgggaggca taatgccgat ggaaaaattt agtatgccaa cccgaattta ttcgggaaca 60
gatagtttga aggaattaga aacccttcac aatgaacgaa ttttgttagt ttgtgactca 120
ttcttacctg gtagtgacac attaaaggaa attgagagtc atattaacga cagtaataaa 180
tgtgaaattt tctctgatgt tgtccctgat ccaccactag ataaaattat ggaaggggtt 240
caacagttct taaagctgaa accaacaatt gtaattggta tcggtgggtgg ttctgcaatg 300
gacaccggtg aggggaattcg tttcttcggt gaaaagcttg gcaagtgcga aattaatgaa 360

tataattgcaa	ttccaacaac	cagcgggaacc	ggttcagaag	ttactaatac	tgcgggttatt	420
tctgatacta	aggaacacccg	gaagattccg	attcttgaag	attacttaac	accagattgt	480
gcattgcttg	atcctaagtt	agtaatgaca	gcaccaaaga	gtgttactgc	ctactcagga	540
atggatgtat	taactcatgc	tcttgaatca	ttggttgcta	aggacgctaa	tttgtttacc	600
gttgcaattat	cagaagaagc	cattgatgcg	gtaactaagt	atcttgttga	atgttatcgt	660
catggcgata	atgtcgatgc	acgaaagatc	gttcacgaag	catcaaatat	tgcgggaaca	720
gccctttaaca	ttgctggact	aggatatttgc	cactcaattg	cccaccaatt	aggtgctaac	780
ttccatgttc	ctcatgggtt	agcaaacaca	atgttattgc	catatgttgt	tgcatacaat	840
gctgaacact	gtgaagaagc	cttacacaag	tttgcaattg	ccgetaagaa	agccgggaatt	900
gctgcacctg	gcgttggtga	ccgtttggct	gttaagcggc	tgattgcaaa	gattcgtgaa	960
atggcacggc	aaatgaattg	tccaatgact	ctccaagcat	ttggagttga	ccacgcacaaa	1020
gcagaagcag	ctgctgatac	ggttgttgct	aatgcgaaga	aggatgcaac	attcccaggc	1080
aateccagttg	ttccttcaga	tgatgatctg	aagatgattt	acgaagcaat	aattcgttaa	1140

<210> 17
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus reuteri

<400> 17

Met	Asn	Arg	Gln	Phe	Asp	Phe	Leu	Met	Pro	Ser	Val	Asn	Phe	Phe	Gly
1				5					10					15	
Pro	Gly	Val	Ile	Ala	Lys	Ile	Gly	Asp	Arg	Ala	Lys	Met	Leu	Asn	Met
			20					25					30		
His	Lys	Pro	Leu	Ile	Val	Thr	Thr	Glu	Gly	Leu	Ser	Lys	Ile	Asp	Asn
		35					40					45			
Gly	Pro	Val	Lys	Gln	Thr	Val	Ala	Ser	Leu	Glu	Lys	Ala	Gly	Val	Asp
	50					55					60				

Tyr Ala Val Phe Thr Gly Ala Glu Pro Asn Pro Lys Ile Arg Asn Val
65 70 75 80

Gln Ala Gly Lys Lys Met Tyr Gln Asp Glu Asn Cys Asp Ser Ile Ile
85 90 95

Thr Val Gly Gly Gly Ser Ala His Asp Cys Gly Lys Gly Ile Gly Ile
100 105 110

Val Leu Thr Asn Gly Asp Asp Ile Ser Lys Leu Ala Gly Ile Glu Thr
115 120 125

Leu Lys Asn Pro Leu Pro Pro Leu Met Ala Val Asn Thr Thr Ala Gly
130 135 140

Thr Gly Ser Glu Leu Thr Arg His Ala Val Ile Thr Asn Glu Lys Thr
145 150 155 160

His Leu Lys Phe Val Val Val Ser Trp Arg Asn Ile Pro Leu Val Ser
165 170 175

Phe Asn Asp Pro Met Leu Met Leu Asp Ile Pro Lys Asp Ile Thr Ala
180 185 190

Ala Thr Gly Cys Asp Ala Phe Val Gln Ala Ile Glu Pro Tyr Val Ser
195 200 205

Val Asp His Asn Pro Ile Thr Asp Ser Gln Cys Lys Glu Ala Ile Gln
210 215 220

Leu Ile Gln Thr Ala Leu Pro Glu Val Val Ala Asn Gly His Asn Ile
225 230 235 240

Glu Ala Arg Thr Lys Met Val Glu Ala Glu Met Leu Ala Gly Met Ala
245 250 255

Phe Asn Asn Ala Asn Leu Gly Tyr Val His Ala Met Ala His Gln Leu
260 265 270

Gly Gly Gln Tyr Asp Ala Pro His Gly Val Cys Cys Ala Leu Leu Leu
275 280 285

Thr Thr Val Glu Glu Tyr Asn Leu Ile Ala Cys Pro Glu Arg Phe Ala
290 295 300

Glu Leu Ala Lys Val Met Gly Phe Asp Thr Thr Gly Leu Thr Leu Tyr
305 310 315 320

Glu Ala Ala Gln Lys Ser Ile Asp Gly Met Arg Glu Met Cys Arg Leu
325 330 335

Val Gly Ile Pro Ser Ser Ile Lys Glu Ile Gly Ala Lys Pro Glu Asp
340 345 350

Phe Glu Met Met Ala Lys Asn Ala Leu Lys Asp Gly Asn Ala Phe Ser
355 360 365

Asn Pro Arg Lys Gly Thr Val Glu Asp Ile Val Lys Leu Tyr Gln Lys
370 375 380

Ala Tyr Asp Gly Ile Tyr
385 390

<210> 18
<211> 1173
<212> DNA
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 18
atgaatagac aatttgattt cttaatgcca agtgtgaact tctttgggtcc tgggtgttatt 60
gctaaaattg gtgatcgtgc aaagatgctc aatatgcaca aaccattgat tgttactact 120
gaaggtttat ccaagattga caatggctct gtaaagcaaa ccgttgcttc attggaaaag 180
gctggcgttg actatgccgt atttactggc gctgaaccta accctaagat ccggaatgtt 240
caagctggta aaaagatgta ccaagatgaa aactgtgact caattattac tgttgggtggg 300

```

ggttctgctc acgactgtgg taagggatc ggtattgttt taactaacgg tgatgacatt      360
tccaagcttg ccggaattga aacattgaag aatccacttc caccattgat ggctgttaac      420
actactgccg gaactgggttc tgaattaaact cgtcacgctg ttattactaa cgaaaagact      480
catttgaaagt ttgtttgttg ttcattggcgt aacattccat tggatcatt caacgatcca      540
atgttgatgc ttgatattcc aaaagacatt accgctgcta ctggttgtga tgcTTTTgtt      600
caggctattg aaccatacgt ttcgtttgac cataacccaa ttactgatag tcaatgtaaa      660
gaagctattc aattaattca aactgcttta ccagaagtag ttgctaattgg tcacaatatt      720
gaagcacgga ctaagatggg tgaagctgaa atgcttgccg gaatggcctt caataatgcc      780
aaettaggct atgttcacgc aatggctcac caacteggtg gteaatatga tgctcctcat      840
ggtgTTTTgct gtgccttgct cttgaccact gttgaagaat ataacttaat cgcattgtcca      900
gagcggTTTTg ctgaattggc taaggtaatg ggctttgaca ctactggctc taccctttac      960
gaagcagcac aaaagtcaat tgacgggatg cgtgaaatgt gccggcttgt tggtatcca      1020
tcatcaatca aggaaattgg tgctaagcca gaagactttg aaatgatggc caagaatgcc      1080
ctcaaggatg gtaatgcctt ctctaacca cgtaagggtg ctgttgaaga tattgtaaag      1140
ctttatcaaa aggcttacga tggcatctac taa                                     1173

```

<210> 19

<211> 616

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 19

```

Met Ala Thr Glu Lys Val Ile Gly Val Asp Ile Gly Asn Ser Ser Thr
1          5          10          15

```

```

Glu Val Ala Leu Ala Asp Val Ser Asp Ser Gly Gln Val His Phe Ile
          20          25          30

```

```

Asn Ser Gly Ile Ala Pro Thr Thr Gly Ile Lys Gly Thr Lys Gln Asn
          35          40          45

```

Leu Val Gly Ile Arg Asp Ser Ile Thr Gln Val Leu Asn Lys Ser Asn
50 55 60

Leu Thr Ile Asp Asp Ile Asp Leu Ile Arg Ile Asn Glu Ala Thr Pro
65 70 75 80

Val Ile Gly Asp Val Ala Met Glu Thr Ile Thr Glu Thr Val Val Thr
85 90 95

Glu Ser Thr Met Ile Gly His Asn Pro Asn Thr Pro Gly Gly Ile Gly
100 105 110

Thr Gly Ala Gly Ile Thr Val Arg Leu Leu Asp Leu Leu Lys Lys Thr
115 120 125

Asp Lys Ser Lys Asn Tyr Ile Val Val Val Pro Lys Asp Ile Asp Phe
130 135 140

Glu Asp Val Ala Lys Leu Ile Asn Ala Tyr Val Ala Ser Gly Tyr Lys
145 150 155 160

Ile Thr Ala Ala Ile Leu Arg Asn Asp Asp Gly Val Leu Val Asp Asn
165 170 175

Arg Leu Asn His Lys Ile Pro Ile Val Asp Glu Val Ala Met Ile Asp
180 185 190

Lys Val Pro Leu Asn Met Leu Ala Ala Val Glu Val Ala Gly Pro Gly
195 200 205

Gln Val Ile Ser Gln Leu Ser Asn Pro Tyr Gly Ile Ala Thr Leu Phe
210 215 220

Gly Leu Thr Pro Glu Glu Thr Lys Asn Ile Val Pro Val Ser Arg Ala
225 230 235 240

Leu Ile Gly Asn Arg Ser Ala Val Val Ile Lys Thr Pro Ala Gly Asp
245 250 255

Val	Lys	Ala	Arg	Val	Ile	Pro	Ala	Gly	Lys	Ile	Ile	Ile	Asn	Gly	Asp		
			260					265					270				
Thr	Gly	Lys	Glu	Glu	Val	Gly	Val	Ser	Glu	Gly	Ala	Asp	Ala	Ile	Met		
		275					280					285					
Lys	Lys	Val	Ser	Ser	Phe	Arg	His	Ile	Asn	Asn	Ile	Thr	Gly	Glu	Ser		
	290					295					300						
Gly	Thr	Asn	Val	Gly	Gly	Met	Leu	Glu	Asn	Val	Arg	Gln	Thr	Met	Ala		
305					310					315					320		
Asp	Leu	Thr	Gly	Lys	Lys	Asn	Asp	Glu	Ile	Ala	Ile	Gln	Asp	Leu	Leu		
				325					330					335			
Ala	Val	Asp	Thr	Gln	Val	Pro	Val	Glu	Val	Arg	Gly	Gly	Leu	Ala	Gly		
			340					345					350				
Glu	Phe	Ser	Asn	Glu	Ser	Ala	Val	Gly	Ile	Ala	Ala	Met	Val	Lys	Ser		
		355					360					365					
Asp	His	Leu	Gln	Met	Glu	Val	Ile	Ala	Lys	Leu	Ile	Glu	Lys	Glu	Phe		
	370						375				380						
Asn	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Gly	Gly	Ala	Glu	Val	Glu	Ser	Ala	Ile	Arg		
385					390					395					400		
Gly	Ala	Leu	Thr	Thr	Pro	Gly	Thr	Asp	Lys	Pro	Ile	Ala	Ile	Leu	Asp		
				405					410					415			
Leu	Gly	Ala	Gly	Ser	Thr	Asp	Ala	Ser	Ile	Ile	Asn	Lys	Glu	Asn	Asn		
			420					425					430				
Thr	Val	Ala	Ile	His	Leu	Ala	Gly	Ala	Gly	Asp	Met	Val	Thr	Met	Ile		
		435					440					445					

Ile Asn Ser Glu Leu Gly Leu Asn Asp Ile His Leu Ala Glu Asp Ile
450 455 460

Lys Arg Tyr Pro Leu Ala Lys Val Glu Asn Leu Phe Gln Ile Arg His
465 470 475 480

Glu Asp Gly Ser Val Gln Phe Phe Lys Asp Pro Leu Pro Ser Ser Leu
485 490 495

Phe Ala Lys Val Val Val Ile Lys Pro Asp Gly Tyr Glu Pro Val Thr
500 505 510

Gly Asn Pro Ser Ile Glu Lys Ile Lys Leu Val Arg Gln Ser Ala Lys
515 520 525

Lys Arg Val Phe Val Thr Asn Ala Leu Arg Ala Leu Lys Tyr Val Ser
530 535 540

Pro Thr Gly Asn Ile Arg Asp Ile Pro Phe Val Val Ile Val Gly Gly
545 550 555 560

Ser Ala Leu Asp Phe Glu Ile Pro Gln Leu Val Thr Asp Glu Leu Ala
565 570 575

His Phe Asn Leu Val Ala Gly Arg Gly Asn Val Arg Gly Val Glu Gly
580 585 590

Pro Arg Asn Ala Val Ala Thr Gly Leu Ile Leu Arg Tyr Gly Glu Glu
595 600 605

Arg Arg Lys Arg Tyr Glu Gln Arg
610 615

<210> 20

<211> 1851

<212> DNA

<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 20

atggcaactg	aaaaagtaat	tgggtgttgat	attgggaatt	cttccactga	agttgcattg	60
gcagatgtaa	gcgatatgtg	gcaagttcac	tttattaact	ctggatttgc	tccactact	120
gggattaaag	gtactaagca	gaatctagtt	ggaattaggg	attcaattac	tcaagttctg	180
aataaatcta	atctgacaat	cgatgatatt	gattttaattc	gaatcaatga	agccacgcca	240
gtaattgggtg	atgttgcaat	ggaaactatt	acagaaacag	ttgtaacaga	atcaacaatg	300
attgggcata	atcctaatac	accagggtgg	ataggaacag	gggctgggat	aacagttcgt	360
ttgcttgatc	tcttaaagaa	aactgataaa	agcaaaaatt	atatgttgt	agttcctaag	420
gatattgatt	ttgaagacgt	tgctaaactt	atcaatgctt	atgttgccctc	tggttataaa	480
ataacagcag	caattcttaag	aaacgatgat	ggtgttttag	ttgataatcg	gttaaatacat	540
aaaattccga	ttgtcgatga	agttgctatg	attgacaaag	tccggttaaa	tatgctggca	600
gctgtagaag	ttgctggccc	tggacaagta	atttcacaa	tttcaaacc	gatatggatc	660
gctaccttat	ttggactaac	tccagaagag	actaagaata	ttgttccagt	ttctcgagcg	720
cttattggaa	atcgttcggc	tgttgttatt	aagactccag	ctggggatgt	taaagcgcga	780
gtaattccag	caggtaaaat	cataattaat	ggtgatactg	gaaaagaaga	agttggagtt	840
tctgaagggtg	ctgacgccat	tatgaaaaag	gtttctagtt	tccgccatat	taacaatata	900
actggtgagt	ctggaaccac	tgttggagga	atgttggaaa	atgttcgtca	aacaatggca	960
gatcttacag	gaaagaaaaa	tgatgaaatt	gctattcaag	atttacttgc	tgttgatact	1020
caagtaccag	ttgaagtctg	aggcggctca	gctgggtgaat	tctcaaatga	atcagcagtt	1080
gggatcgcag	caatgggttaa	gtcagatcat	cttcaaatgg	aagtatttgc	taaacttatt	1140
gaaaaagaat	ttaatacaaa	ggttgaaatt	ggtgggtgctg	aagttgaatc	tgcaattcgt	1200
ggagcattaa	caactccagg	aacagataag	ccaatcgcaa	tccttgattt	aggtgctggc	1260
tcaacagatg	cttcaatcat	taataaagaa	aataatacag	ttgcaattca	cttagctggg	1320
gctggtgata	tggtaacgat	gattattaat	tctgaattag	gattgaatga	tattcatctt	1380
gcagaagaca	tcaaacgcta	cccattagca	aaggtagaaa	acctttttca	aattcgacat	1440
gaggatgggtt	cggttcaatt	ctttaaagat	ccgccttccat	catcactggt	tgccaaagtt	1500

```

gtagtaatta aaccagatgg atacgaacca gtaactggga atccaagcat tgaaaaaatt 1560
aaattagtgc gtcaaagtgc aaagaaacga gtatttgta cgaacgcttt acgggcactt 1620
aagtatgtta gtccaactgg aaatattcgt gatattccgt ttgttgtaat tgtcggtggt 1680
tcagcccttag actttgaaat tccacaactt gttacagatg aattagcaca ctttaattta 1740
gttgctggtc gaggaaatgt tcgtggagtt gaaggaccac gaaatgccgt tgcaactgga 1800
ttgattttaa ggtatggcga agaaaagaagg aagcgttatg aacaacgatg a 1851

```

```

<210> 21
<211> 615
<212> PRT
<213> Lactobacillus reuteri

```

```

<400> 21

```

```

Met Ala Thr Glu Lys Val Ile Gly Val Asp Ile Gly Asn Ser Ser Thr
1          5          10          15

```

```

Glu Val Ala Leu Ala Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Ile Asn Phe Ile
          20          25          30

```

```

Gly Ser Gly Ile Ala Pro Thr Thr Gly Ile Lys Gly Thr Lys Gln Asn
          35          40          45

```

```

Leu Val Gly Ile Arg Asp Ser Ile Asn Gln Val Leu Asn Lys Ala Asn
          50          55          60

```

```

Leu Thr Ile Asn Asp Ile Asp Leu Ile Arg Ile Asn Glu Ala Thr Pro
65          70          75          80

```

```

Val Ile Gly Asp Val Ala Met Glu Thr Ile Thr Glu Thr Val Val Thr
          85          90          95

```

```

Glu Ser Thr Met Ile Gly His Asn Pro Asp Thr Pro Gly Gly Ile Gly
          100          105          110

```

```

Thr Gly Ala Gly Ile Thr Val Arg Leu Leu Asp Leu Val Lys Lys Thr
          115          120          125

```


Asp	Lys	Ser	Gln	Asn	Tyr	Ile	Val	Val	Val	Pro	Lys	Asp	Ile	Asp	Phe
130						135					140				
Glu	Asp	Val	Ala	Lys	Leu	Ile	Asn	Ala	Tyr	Val	Ala	Ser	Gly	Tyr	Lys
145					150					155					160
Ile	Thr	Ala	Ala	Ile	Leu	Lys	Asn	Asp	Asp	Gly	Val	Leu	Val	Asp	Asn
				165					170					175	
Arg	Leu	Asn	Lys	Pro	Ile	Pro	Ile	Val	Asp	Glu	Val	Ala	Met	Ile	Asp
			180					185					190		
Lys	Val	Pro	Leu	Asn	Met	Leu	Ala	Ala	Val	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Gly
		195					200					205			
Gln	Val	Ile	Ser	Gln	Leu	Ser	Asn	Pro	Tyr	Gly	Ile	Ala	Thr	Leu	Phe
210						215					220				
Gly	Leu	Asn	Pro	Glu	Glu	Thr	Lys	Asn	Ile	Val	Pro	Val	Ser	Arg	Ala
225					230					235					240
Leu	Ile	Gly	Asn	Arg	Ser	Ala	Val	Val	Ile	Lys	Thr	Pro	Ala	Gly	Asp
			245						250					255	
Val	Lys	Ala	Arg	Val	Ile	Pro	Ala	Gly	Asn	Ile	Ile	Ile	Asn	Ser	Asp
			260					265					270		
Thr	Gly	Lys	Glu	Glu	Val	Gly	Val	Ser	Glu	Gly	Ala	Asp	Ala	Ile	Met
		275					280					285			
Lys	Lys	Val	Ser	Ser	Phe	Arg	His	Ile	Asn	Asp	Ile	Thr	Gly	Glu	Ser
	290					295					300				
Gly	Thr	Asn	Val	Gly	Gly	Met	Leu	Glu	Asn	Val	Arg	Gln	Thr	Met	Ala
305					310					315					320

Asp Leu Thr Gly Lys Lys Asn Ser Glu Ile Ala Ile Gln Asp Leu Leu
325 330 335

Ala Val Asp Thr Gln Val Pro Val Glu Val Arg Gly Gly Leu Ala Gly
340 345 350

Glu Phe Ser Asn Glu Ser Ala Val Gly Ile Ala Ala Met Val Lys Ser
355 360 365

Asp His Leu Gln Met Glu Val Ile Ala Lys Leu Ile Glu Asp Glu Phe
370 375 380

His Thr Lys Val Glu Ile Gly Gly Ala Glu Val Glu Ser Ala Ile Arg
385 390 395 400

Gly Ala Leu Thr Thr Pro Gly Thr Asp Lys Pro Ile Ala Ile Leu Asp
405 410 415

Leu Gly Ala Gly Ser Thr Asp Ala Ser Ile Ile Asn Lys Glu Asn Gln
420 425 430

Thr Val Ala Ile His Leu Ala Gly Ala Gly Asp Met Val Thr Met Ile
435 440 445

Ile Asn Ser Glu Leu Gly Leu Asn Asp Ile His Leu Ala Glu Asp Ile
450 455 460

Lys Arg Tyr Pro Leu Ala Lys Val Glu Asn Leu Phe Gln Ile Arg His
465 470 475 480

Glu Asp Gly Ser Val Gln Phe Phe Glu Asp Pro Leu Pro Ser Ser Leu
485 490 495

Phe Ala Arg Val Val Val Ile Lys Pro Asp Gly Tyr Glu Pro Val Thr
500 505 510

Gly Asn Pro Ser Ile Glu Lys Ile Lys Leu Val Arg Gln Ser Ala Lys
515 520 525

Lys Arg Val Phe Val Thr Asn Ala Leu Arg Ala Leu Lys Tyr Val Ser
530 535 540

Pro Thr Gly Asn Ile Arg Asp Ile Pro Phe Val Val Ile Val Gly Gly
545 550 555 560

Ser Ala Leu Asp Phe Glu Ile Pro Gln Leu Val Thr Asp Glu Leu Ala
565 570 575

His Phe Asn Leu Val Ala Gly Arg Gly Asn Val Arg Gly Val Glu Gly
580 585 590

Pro Arg Asn Ala Val Ala Thr Gly Leu Ile Leu Arg Tyr Gly Glu Glu
595 600 605

Arg Arg Lys Gln Tyr Glu Gln
610 615

<210> 22
<211> 1848
<212> DNA
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 22
atggcaactg aaaaagtaat tgggtgttgat atttggttaatt cttccactga agtagcgtta 60
gctgatgttg ctgataatgg aacaattaac tttattggct ctggaatagc ccctactact 120
ggatatcaagg gtacaaaaca aaatctgggtt ggaattagag attccatcaa tcaagtcctt 180
aataaggcta atttaacgat taatgatatt gatttaattc ggattaatga ggcaacgcca 240
gttatcgggtg acgtagcgat ggaaacaatt accgaaacgg tcgtaaccga atcgactatg 300
atcggacata atcctgatac tcccgggtggt atttggaactg gtgcaggaat aacagttaga 360
ctattggatc ttgtcaaaaa gacggataaa agtcaaaaact atattgttgt tgttcccaag 420
gatattgatt ttgaagatgt tgctaaactg attaacgcct atgttgcttc gggctataag 480
attacagctg cgatcctaaa aaatgatgat ggtgtgttag ttgataatcg attgaataaa 540

ccaattccga ttgttgatga agttgccatg attgataaag tcccattaaa tatgctggcg	600
gcagttgaag ttgctggttc gggacaagtt atctcgcac tttcaaattcc atatggaatt	660
gctaccttgt ttggattgaa tccagaagaa accaagaata ttgttcctgt ctcacgtgca	720
cttattggta accgttctgc cgttgtcatt aagacaccag caggggatgt taaggcacgg	780
gtaattccag ccggaaacat tatcattaac agcgataccg gaaaagaaga agttggtggt	840
tcagaagggtg ctgacgccat tatgaagaaa gtttccagtt tccgtcacat taatgatatt	900
actggagaat cagggactaa cgttggtgga atgcttgaaa atgttcgcca aacaatggct	960
gatttaactg gaaagaagaa tagtgaaatt gctattcaag atctattagc ggtagataca	1020
caggtgcctg tcgaagttcg cgggggcttg gctggtgaat tttcaaata ga atcagcagtt	1080
ggtattgctg cgatgggttaa gtctgatcat cttcaaattgg aagtaattgc taaattaatt	1140
gaggatgaat tccatacgaa ggttgagatt ggtgggtgccg aagttgaatc tgcaattcgc	1200
ggtgcattaa cgacaccggg aacagataaa ccaattgcaa ttcttgattt aggtgccggc	1260
tcaacagatg cttcaattat caataaagaa aatcaaaactg tagcaattca cttagctggt	1320
gctggtgaca tggttacgat gattattaac tctgaattgg gattaaatga cattcacttg	1380
gcagaggata ttaagcgcta tccattagct aaagtcgaaa atctattcca aattcgtcat	1440
gaagatggat cggtaacaatt ctttgaagat ccgcttcctg catcattatt tgctcgtggt	1500
gttgtaatca aaccagatgg gtatgaaccg gttacgggta atccaagcat tgagaagatc	1560
aagctggttc gtcaaagtgc taagaagcgg gtattttgtaa ccaatgcatt acgagctctt	1620
aagtacgtca gcccgacagg aaacattcgt gatattccgt ttgttgtaat tgtcgggtgga	1680
tctgctcttg actttgaaat accacaactg gtaacagatg agttagcaca ctttaactta	1740
gttgccggac gtgggaatgt tcgtggagta gaaggccac gaaacgcggg tgcaacagga	1800
ttaattctcc gttatggcga agaaagaaga aagcaatatg aacaatga	1848

<210> 23

<211> 119

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 23

Met Asn Asn Asp Asp Ser Gln Arg Pro Ser Ile Val Val Gly Leu Glu
1 5 10 15

Asn Gly Ile Thr Ile Pro Asp Ser Val Lys Pro Leu Phe Tyr Gly Ile
20 25 30

Glu Glu Glu Gln Ile Pro Val Ser Val Arg Lys Ile Asn Ile Asn Asp
35 40 45

Thr Val Glu Arg Ala Tyr Gln Ser Ala Leu Ala Ser Arg Leu Ser Val
50 55 60

Gly Ile Ala Phe Glu Gly Asp His Phe Ile Val His Tyr Lys Asn Leu
65 70 75 80

Lys Glu Asn Gln Pro Leu Phe Asp Met Thr Ile Asn Asp Lys Lys Gln
85 90 95

Leu Arg Ile Leu Gly Ala Asn Ala Ala Arg Leu Val Lys Gly Ile Pro
100 105 110

Phe Lys Glu Met Ala Asn Arg
115

<210> 24

<211> 360

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 24

atgaacaacg atgattcaca acgtccctcg attgtcgtcg gactagaaaa tggaataacg 60
attccagata gtgtcaagcc acttttttat ggaattgaag aagaacagat cccagtctca 120
gttcgtaaaa tcaatataaa tgatactgtt gaaagagcat accaatcagc tcttgcacat 180
aggctatctg taggaattgc ttttgaagga gatcatttta ttgttcacta taagaactta 240
aaagaaaatc agccttttatt tgatatgaca atcaatgata aaaagcaatt acgaatttta 300

ggagcaaatg cagcgagatt agtaaaagga atccctttta aggaaatggc aaacaggtga 360

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 25

Met Asn Asn Asp Ser Glu Arg Pro Ser Ile Ile Val Gly Val Glu Asn
1 5 10 15

Gly Thr Ala Ile Pro Gln Asn Ala Ala Pro Leu Phe Asn Gly Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Gln Ile Pro Val Ala Val Arg Glu Ile Asp Ile Asp Asn Val
35 40 45

Leu Ser Arg Ala Tyr Gln Ser Ala Leu Ala Ser Arg Leu Ser Val Gly
50 55 60

Ile Ala Phe Asp Gly Asp Arg Phe Ile Val His Tyr Lys Asn Leu Lys
65 70 75 80

Glu Asn Lys Pro Leu Phe Asp Lys Thr Ile Ser Asp Gly Lys Gln Leu
85 90 95

Arg Val Leu Gly Ala Asn Ala Ala Arg Leu Val Lys Gly Ile Pro Phe
100 105 110

Lys Glu Met Val Asn Arg
115

<210> 26

<211> 357

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 26

atgaacaatg attcagagcg tccctcaatt atcgtaggtg ttgagaatgg aacagctatt 60

cctcaaaatg cagcaccgct ttttaacgga attgaagaag aacaaatacc ggtggcggtt	120
agagaaatcg acattgataa tgttttaagt cgggcatacc agtcggccct cgcctcacga	180
ttatcagtag ggattgcttt tgatggtgat cgatttatcg ttcactataa aaacttaaaa	240
gaaaacaaac cactatttga taaaacaatt agtgatggta agcaactacg agttctagga	300
gcaaatgcag cgcgactagt aaagggaatc ccccttaagg aaatggtaaa cagggtga	357

<210> 27
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 27	
atgaaacgtc aaaaacgatt tgaagaacta gaaaaaac	37

<210> 28
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 28	
ttagttatcg ccccttagct tcttacgact tt	32

<210> 29
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 29	
atgaaacgtc aaaaacgttt tgaagaacta	30

<210> 30
 <211> 25
 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 30

ctagttatca cccttgagct tcttt

25

<210> 31

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 31

atgggaggca taattccaat ggaaaaata

29

<210> 32

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 32

ttaacgaatt attgcttcgt aaaccatctt c

31

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 33

atgggaggca taatgccgat g

21

<210> 34

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 34

ttaacgaatt attgcttcgt aaatcatctt c

31

<210> 35

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 35

atgaatagac aatttgattt cttaatgcc a g

32

<210> 36

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 36

ttagtagatg ccatcgtaag cttttt

26

<210> 37

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 37

atggcaactg aaaaagtaat tgggtgttgat att

33

<210> 38

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 38
tcacctgttt gccatttcct taaaaggga t 31

<210> 39
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 39
atggcaactg aaaaagtaat tgggtgttg 28

<210> 40
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 40
tcacctgttt accatttcct taaagg 26

<210> 41
<211> 477
<212> PRT
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 41

Met Gln Ile Asn Asp Ile Glu Ser Ala Val Arg Lys Ile Leu Ala Glu
1 5 10 15

Glu Leu Asp Asn Ala Ser Ser Ser Ser Ala Asn Val Ala Ala Thr Thr
20 25 30

Asp Asn Gly His Arg Gly Ile Phe Thr Asn Val Asn Asp Ala Ile Ala
35 40 45

Ala Ala Lys Ala Ala Gln Glu Ile Tyr Arg Asp Lys Pro Ile Ala Val
50 55 60

Arg	Gln	Gln	Val	Ile	Asp	Ala	Ile	Lys	Glu	Gly	Phe	Arg	Pro	Tyr	Ile	
65					70					75					80	
Glu	Lys	Met	Ala	Lys	Asp	Ile	Lys	Glu	Glu	Thr	Gly	Met	Gly	Thr	Val	
				85					90					95		
Glu	Ala	Lys	Ile	Ala	Lys	Leu	Asn	Asn	Ala	Leu	Tyr	Asn	Thr	Pro	Gly	
			100					105						110		
Pro	Glu	Ile	Leu	Glu	Pro	Val	Val	Glu	Asn	Gly	Asp	Gly	Gly	Met	Val	
		115					120					125				
Met	Tyr	Glu	Arg	Leu	Pro	Tyr	Gly	Val	Ile	Gly	Ala	Val	Gly	Pro	Ser	
	130					135					140					
Thr	Asn	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Ile	Ala	Asn	Ala	Ile	Met	Met	Leu	Ala	
145					150					155					160	
Gly	Gly	Asn	Thr	Leu	Tyr	Phe	Gly	Ala	His	Pro	Gly	Ala	Lys	Asn	Val	
				165					170					175		
Thr	Arg	Trp	Thr	Ile	Glu	Lys	Met	Asn	Asp	Phe	Ile	Ala	Asp	Ala	Thr	
			180					185					190			
Gly	Leu	His	Asn	Leu	Val	Val	Ser	Ile	Glu	Thr	Pro	Thr	Ile	Glu	Ser	
		195					200					205				
Val	Gln	Gln	Met	Met	Lys	His	Pro	Asp	Ile	Ala	Met	Leu	Ala	Val	Thr	
						215					220					
Gly	Gly	Pro	Ala	Val	Val	His	Gln	Ala	Met	Thr	Ser	Gly	Lys	Lys	Ala	
225					230					235					240	
Val	Gly	Ala	Gly	Pro	Gly	Asn	Pro	Pro	Ala	Met	Val	Asp	Ala	Thr	Ala	
				245					250					255		

Asp Ile Asp Leu Ala Ala His Asn Ile Ile Thr Ser Ala Ser Phe Asp
260 265 270

Asn Asp Ile Leu Cys Thr Ala Glu Lys Glu Val Val Ala Glu Ser Ser
275 280 285

Ile Lys Asp Glu Leu Ile Arg Lys Met Gln Asp Glu Gly Ala Phe Val
290 295 300

Val Asn Arg Glu Gln Ala Asp Lys Leu Ala Asp Met Cys Ile Gln Glu
305 310 315 320

Asn Gly Ala Pro Asp Arg Lys Phe Val Gly Lys Asp Ala Thr Tyr Ile
325 330 335

Leu Asp Gln Ala Asn Ile Pro Tyr Thr Gly His Pro Val Glu Ile Ile
340 345 350

Cys Glu Leu Pro Lys Glu His Pro Leu Val Met Thr Glu Met Leu Met
355 360 365

Pro Ile Leu Pro Val Val Ser Cys Pro Thr Phe Asp Asp Val Leu Lys
370 375 380

Thr Ala Val Glu Val Glu Lys Gly Asn His His Thr Ala Thr Ile His
385 390 395 400

Ser Asn Asn Leu Lys His Ile Asn Asn Ala Ala His Arg Met Gln Cys
405 410 415

Ser Ile Phe Val Val Asn Gly Pro Ser Tyr Val Gly Thr Gly Val Ala
420 425 430

Asp Asn Gly Ala His Ser Gly Ala Ser Ala Leu Thr Ile Ala Thr Pro
435 440 445

Thr Gly Glu Gly Thr Cys Thr Ala Arg Thr Phe Thr Arg Arg Val Arg
450 455 460

Leu Asn Ser Pro Gln Gly Phe Ser Val Arg Asn Trp Tyr
 465 470 475

<210> 42
 <211> 1434
 <212> DNA
 <213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 42
 atgcagatta atgatat tga aagtgctgta cgcaaaattc ttgccgaaga actagataat 60
 gccagctctt caagtgcaaa cgttgcagct actactgata atggtcacgc cggaattttc 120
 actaatgtca atgatgcaat tgctgctgca aaagctgctc aagaaatata tcgggataag 180
 ccaattgctg ttgcccaaca agtgattgat gccattaagg aaggattccg cccatatatt 240
 gaaaaaatgg ctaaagatat caaagaagaa acaggaatgg gaacagtaga ggccaaaatt 300
 gctaagttaa acaatgccctt gtacaacact cctgggccgc agattccttga accagttgta 360
 gaaaacggtg acgggtgggat gggttatgtat gaacgggttac catatgggtgt tattgggtgcg 420
 gttggcccaa gtacaaaccc ttcagaaact gtaattgcta atgcgatcat gatgcttgcc 480
 ggtggtaata ctcttttactt tgggtgctcac cctggcgcaa agaattgttac tcgctggaca 540
 attgaaaaga tgaacgattt tattgcagat gcaacaggcc ttcataattt agttgtaagt 600
 attgaaacac caacaattga atcagttcaa caaatgatga agcaccgccga cattgcaatg 660
 ttagcagtaa ctgggtggccc agctgtttgtt caccaagcaa tgaccagtgg taagaaagcg 720
 gttgggtgctg gtcctggtaa tcctcctgca atgggtgatg ctactgctga tattgattta 780
 gctgctcata atatcattac atctgcttca tttgataatg atattttatg tactgctgaa 840
 aaggaagtag ttgcagaaaag tagcattaaa gatgaattaa ttcgtaagat gcaagatgaa 900
 ggtgcctttg tagttaaccg tgaacaagcc gataaattag ctgatatgtg tatccaagaa 960
 aatgggtgctc ctgategtaa atttgttggg aaggatgcaa cttatatctt agaccaagct 1020
 aatattcctt acacaggcca cccagttgaa attatttgtg aacttcctaa ggaacatcca 1080
 ttagtaatga ctgaaatgtt aatgcccaatt ttaccagttg tttcttgtcc aacatttgat 1140

gatgttttga agactgctgt tgaagttgaa aaaggtaacc atcacacagc tactattcat 1200
tccaataacc ttaagcatat taataatgct gctcaccgga tgcaatgttc aatctttggt 1260
gttaatggcc catcctatgt tggtaacaggt gttgcagata atggagctca ctcagggtgct 1320
tcagcattaa caattgctac gccaaactggt gaaggaacat gtactgcacg aacatttact 1380
cgtcgggttc gtttgaactc accacaagga ttctcagtac gtaactggta ttaa 1434

<210> 43

<211> 395

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 43

Met Met Ser Lys Lys Ile Leu Ala Ile Asn Ser Gly Ser Ser Ser Ile
1 5 10 15

Lys Phe Lys Leu Tyr Leu Met Pro Glu Glu Lys Leu Leu Ile Ser Gly
20 25 30

Ser Ala Glu Asn Leu Gly Ser Ser Thr Ser Gln Leu Ser Tyr Lys Thr
35 40 45

Asp Lys Thr Asn Glu Thr Arg Gln Ile Pro Leu Lys Asn His Ser Glu
50 55 60

Ala Ile Asp His Ile Ile Asp Val Leu Met Ser Ser Gly Val Val Lys
65 70 75 80

Asp Lys Ser Glu Ile Tyr Gly Val Gly His Arg Ile Ser His Gly Gly
85 90 95

Ser Tyr Tyr Thr His Ala Val Ala Val Thr Pro Glu Val Glu Lys Arg
100 105 110

Ile Asp Glu Leu Lys Val Leu Ser Pro Leu His Asn Pro Asn Gly Leu
115 120 125

Ala Gly Ile Lys Ala Phe Glu Lys Phe Leu Pro Asp Ala Lys Glu Val
130 135 140

Val Thr Phe Asp Asn Ser Phe His His Thr Ile Pro Lys Lys Ala Tyr
145 150 155 160

Met Tyr Ala Leu Pro Tyr Glu Phe Tyr Glu Lys Tyr Gln Ile Arg Arg
165 170 175

Tyr Gly Phe His Ala Pro Ser His Gln Tyr Val Ser Glu Lys Ala Arg
180 185 190

Glu Leu Phe Gly Lys Glu Lys Thr Arg Arg Met Ile Thr Cys His Leu
195 200 205

Gly Asn Gly Ser Ser Val Ser Ala Ile Leu Asp Gly Lys Ser Val Asn
210 215 220

Ser Ser Met Gly Phe Thr Pro Leu Ala Gly Val Val Met Gly Thr Arg
225 230 235 240

Cys Gly Asp Ile Asp Pro Glu Ile Ile Pro Phe Leu Glu Glu Glu Leu
245 250 255

Asn Ile Asp Ser His Glu Met Arg Arg Ile Met Asn Glu Asp Ser Gly
260 265 270

Leu Lys Gly Leu Ser Gly Ile Ser Asn Asp Glu Arg Glu Ile Glu Ser
275 280 285

Ala Ala Lys Asn Gly Asn Glu Arg Ala Gln Leu Ala Leu Asp Val Phe
290 295 300

Val His Ser Ile Gln Gln Tyr Ile Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Leu Asp
305 310 315 320

Gly Leu Asp Thr Leu Val Phe Thr Ala Gly Ile Gly Glu His Ala Ala
325 330 335

Tyr Ile Arg Ser Gln Ile Cys Lys Asn Leu Asp Tyr Leu Gly Val Lys
340 345 350

Ile Asp Glu Glu Lys Asn Lys Asn Asn Glu Leu Ser Ile Glu Ala Pro
355 360 365

Asp Ser Lys Val Lys Ile Ala Val Ile Pro Thr Asn Glu Glu Ile Ile
370 375 380

Ile Ala Arg Asp Val Met Asn Val Thr Gln Gln
385 390 395

<210> 44
<211> 1188
<212> DNA
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 44
ttgatgtcaa aaaaaataact tgcaattaat tctggtagtt catcaattaa gttcaaactt 60
tacttgatgc cagaggagaa actattaatt agtggttctg ctgaaaatct tggttcttcg 120
acaagtcagc ttcatataa aactgataaa actaacgaga caagacaaat ccctttaaaa 180
aaccactcag aggcaattga ccatattatt gatgttttaa tgtctagtgg ggttgtttaag 240
gataagtcag aaatttatgg tgttgggtcac cggatttctc atggcggaag ttactatact 300
catgcagtgg cagtcactcc agaagttgaa aaacggattg atgaattgaa ggtgttatca 360
cctctgcata atccaaatgg actagcaggg ataaaagcct ttgaaaagtt tcttcagat 420
gccaaaggaag tagttacttt cgataattca ttcatcata caatccctaa gaaagcttat 480
atgtatgctt tgccatatga gttttatgaa aagtatcaaa ttaggcgcta cgggttccat 540
gccccttcac atcagtatgt gtcagaaaaa gcgcgtgaac tttttggtaa agaaaagact 600
cgtcgtatga tcacgtgtca tttgggaaat ggatcaagcg tttcggcgat cttagatgga 660
aagtcggtta actcttcaat gggctttact ccgtttagcag gtgtagtgat gggaacgcga 720
tgtggagata ttgatccaga aattattcct tttcttgaag aagaactcaa tattgattca 780

catgaaatg	cgtcgaataat	gaatgaagac	tcagggcctta	aaggccttatac	tgggatttct	840
aatgatgaac	gtgagattga	aagtgcggct	aaaaacggta	acgaacgggc	acaattagct	900
ttagatgtat	ttgtacattc	aattcaacaa	tatatattggag	catatacaac	ggatcttgat	960
ggattggata	cattagtaatt	tacagccgga	attgggtgaac	atgctgctta	tattagaagt	1020
cagatctgta	agaatttaga	ctatcttggga	gtcaaaattg	acgaagagaa	aaataaaaaat	1080
aatgagctaa	gcattgaagc	acctgatagt	aagggttaaaa	tagctgttat	tccaactaac	1140
gaagaaataa	ttattgcccg	tgatgtaatg	aatgtaactc	agcaataa		1188

<210> 45

<211> 1122

<212> DNA

<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 45

atggttgaag	aatttggctc	accatcgtct	tacatccaag	gaaaagggtgt	cctttttgaa	60
agtgataagt	atcttaaaaa	ctttggcaca	aaaccgttat	tattggctgg	cgaaacagtc	120
tataaaattg	taggtaagcg	ttttgaacag	tatcttcaag	aaagtgggtta	tgatgtcacc	180
cgtgttcaat	ttaatgggtga	atcatccact	aacgaagtaa	accggggttac	agaaattgggt	240
aaagaaaata	atgtaactgt	cgttttatggt	cttgggtgggtg	gtaaaacagt	tgataccgcc	300
aaagcaattg	ccgacaatct	ccatctacca	gttgtaatta	tgccaacatt	ggcttcaaat	360
gatgcacctt	gttctcgtct	ttcagtaatc	tacactgatg	acgggtggctt	cgatcattat	420
cgtttctaca	accaaaaacc	taatctgggt	ttagttgata	ctcaagttat	cgttaatggt	480
cccgttcgga	tgcttatattc	tgggaattgct	gatgcttttag	ctaccaatgt	tgaggcacaa	540
gcagttgctc	aagctcatag	tgatacaatg	cttgggtgaaa	aacaaaccct	tgttggaaat	600
gcaatcgccc	agaaatgtga	agagacatta	tttaattact	cgcacctagc	tgtagctgat	660
gcagaaaccc	atgtcgttac	accagcattt	tctaataattg	ttgaagcaaa	tacactaatg	720
agcggctctcg	gtttttgaaag	tgggtggctta	tctgggtgccc	acgctattca	tgatggctta	780
acaatttttag	aagagactca	tgatttaaca	cacgggtgaaa	aggctcgcata	cgggtacctta	840
acacaatttaa	tgttgggaagg	cgcgtgaccag	gaacgctata	acaagtactt	ccaatttatt	900

ctttcttttag	gcctaccaac	tactcttgct	gactctacatt	tagaaaaatgt	caccgatgaa	960
gaaactgctca	atgctggaaa	agccgcttgt	tcagaacaag	ataccatgga	tcgtttgcca	1020
tttaaggtaa	ctccagatga	cgttgctcaa	gcattacgag	cagttgatgc	atatactaaa	1080
caatatTTTaa	ctaateatcg	ttgtcaccat	agtcgtatgt	aa		1122

<210> 46
 <211> 1021
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> recombinant DNA

<400> 46	
gataagacgg	ttcgtgttcg
tgctgacttg	caccatatca
taaaaatcga	aacagcaaag
60	
aatggcggaa	acgtaaaaaga
agttatggaa	ataagactta
gaaagcaaact	taagagtgtg
120	
ttgatagtgc	agtatcttaa
aattttgtat	aataggaatt
gaaagttaa	tagatgctaa
180	
aaatttgtaa	ttaagaagga
gtgattacat	gaacaaaaat
ataaaaatatt	ctcaaaactt
240	
tttaacgagt	gaaaaagtac
tcaaccaaat	aataaaacaa
ttgaatttaa	aagaaaccga
300	
taccgtttac	gaaattggaa
caggtaaagg	gcatttaacg
acgaaactgg	ctaaaaataag
360	
taaacaggta	acgtctattg
aattagacag	tcattctattc
aacttatcgt	cagaaaaatt
420	
aaaactgaat	actcgtgtca
ctttaattca	ccaagatatt
ctacagtttc	aattccctaa
480	
caaacagagg	tataaaaattg
ttggggagtat	tccttaccat
ttaagcacac	aaattattaa
540	
aaaagtgggt	tttgaaagcc
atgcgtctga	catctatctg
attgttgaag	aaggattcta
600	
caagcgtacc	ttggatatct
accgaacact	agggttgctc
ttgcacactc	aagtctcgat
660	
tcagcaattg	cttaagctgc
cagcgggaatg	ctttcatcct
aaaccaaaag	taaacagtgt
720	
cttaataaaa	cttaccgcgc
ataccacaga	tgttccagat
aaatatggga	agctatatac
780	
gtactttgtt	tcaaaatggg
tcaatcgaga	atatcgtaaa
ctgtttacta	aaaatcagtt
840	
tcatcaagca	atgaaacacg
ccaaagtaaa	caatttaagt
accgttactt	atgagcaagt
900	
attgtctatt	tttaatatgt
atctattatt	taacgggagg
aaataattct	atgagtcgct
960	

tttgtaaatt tggaaagtta cacgttacta aaggggaatgt agataaatta ttaggtatac 1020

t 1021

<210> 47

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 47

atgcagatta atgatattga aagtgctgta 30

<210> 48

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 48

ttaataccag ttacgtactg agaatcc 27

<210> 49

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 49

ttgatgtcaa aaaaaatact tgcaattaat tctg 34

<210> 50

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 50
ttattgctga gttacattca ttacatcac 29

<210> 51
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 51
atggttgaag aatttggctc acc 23

<210> 52
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 52
ttacatacga ctatgggtgac aacg 24

<210> 53
<211> 19860
<212> DNA
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 53
tttttgtgta ttaatttght aaatattgcc gttattgaac agttaatcca ataaagacaa 60

taaaatacat aattaatgtg ttagcattat atgtatagaa aacgcataca atttggggaat 120

aatataaaaa ggttgggtgtt tagacatgca tggattttatt ggcgaatttt ttggcaccat 180

ggtttttaatc ctattaggag caggatgttg tgctggtaat agtttgaata aaacatatgg 240

gaaacaaagt ggctgggtgggt ttatctgtat ttcatggggc ttagcagtta caatgggagt 300

ttatgttgca ggatttcttg gttcattagg gcacttaaat cccgctgtaa caattccttt 360

tgctatTTTT ggcttatcc catggagtaa cgttatacct tacttacttg gtcaatttct 420

tggtgcgttt gttgggtgcag tattagtaat tattcaattc tateccacaat ttaaagcaac 480

cccaaatgaa	gaagaaggaa	ataatgttgg	tatTTTTgtc	actcgtccag	cgataaatag	540
tccaatTTTT	aactTTTTct	cagaagtgat	tgcgaccttt	gcattttattt	tcatcttatt	600
aaatcttggc	aacttttacac	agggattgaa	gccattttatc	gtaggaatgg	ttattgacagt	660
tgttggtaaca	tgtctcggga	caactactgg	ctttgcattta	aaaccagctc	gtgattgggtc	720
accacgttta	gcataatacta	ttttgccaat	tcctaataaag	ggtgtttcag	aatgggtggta	780
tgcattgggtt	ccaatgtgtg	gcccatttgt	tgggggcctt	cttgcttggtg	ctttacaaac	840
ggcactagtt	tagtgaacct	agagaaaagg	aggctaatta	atatagcctc	tttatttagt	900
ttaaataaaa	tatgaaatat	ctcgtaggag	aaaaattaatg	aaaaaagaat	ttttaaaaag	960
tagtaatgaa	caattaaaaa	aattttccga	gattgttaat	ggggataagc	ctttacgtaa	1020
agttacggct	gatgaaaagc	taaaggctcg	tgtagattta	ggaacttctt	caattgtttt	1080
aacagtgtctg	gattccaaag	ataagattgt	atacggagcg	tatgaatatg	accatgcagt	1140
tcaagatggg	attgtagtta	atttcattga	atcagttaat	attttaagac	gcttaaaaaga	1200
aaaagctgag	aaagtattag	gacgtgaact	taaaacggca	tgtggtgcta	ttccaccgaa	1260
gacaggagag	aagagtgcc	aagtggttgc	taatgttata	gaagagacag	gcttgctttg	1320
tacagggtgtt	gaagatgaac	cgacagcagc	tgcgaagttc	ttaagattgt	caaattggta	1380
agttgtagat	attggaggag	gaacaactgg	gatttagtatt	tttaagata	acaagctcat	1440
ccatgttatt	gatgaagcaa	caggcggatt	tcatatgacg	cttgttcttg	gaggaaagata	1500
taaaataaaa	aatgatgaag	cagaaaaatt	aaagcgtaac	aagaataaag	aatctgaagt	1560
atatgctgtt	attaaacctg	tagttgagaa	aatggcagca	attgttcaaa	atatgggagt	1620
agaaattatt	gatccagtaa	tagtgggtgg	agggtgcaact	aactttactg	aattttacaac	1680
aacctttagt	aaagatttaa	agcgtaaagt	ttataaacgg	ctttatcctc	aatttgttac	1740
gccactaggg	attgcaatgt	ttgatgatta	gaataaataa	gaggctgggc	acccccaacc	1800
tctttttaat	tttaataaat	tttttcagta	taaatccatt	gaattactga	acgatcaaat	1860
acattaatct	cactagctgg	aataataggt	tgagaacaat	ctactgtata	gacccaacct	1920
gctttattac	taacatcatt	cagatcattt	attgaataga	tatatggata	cccatTTaaa	1980

tcacgggctt	taaaggaaat	atcattttta	ttgaaaaaat	cttttgagat	ttcataaacg	2040
gacttatttg	agcgccattg	taaatctctt	ggaatagtat	agattttctt	tattgcggaa	2100
ttatattttc	gatactttga	tgggtgtcatt	cctacttttt	gcttgaaaaat	tttagtaaaag	2160
taacttgctct	gtgaaaaacc	aacttgatga	gccaatttat	taattgggtgt	atttgaaaaa	2220
attaattttt	cttgagcaag	tgcaattttt	tgtagattta	tatagttaat	aaaatttgtca	2280
ttaaaataat	ttttaaagat	tcgacttaag	tatgatgggtg	agagataaat	cctttgagaa	2340
acgttttcta	aagtaagcga	tttttctaaa	ttggaattaa	tgtatttaag	cgccatgggtt	2400
atattttttt	caatatcact	tagagtacca	tcatttctgt	tattaagaat	aggaggatta	2460
gtaacgttag	ctattgaate	atctccagaa	atattcaaaa	tcccattaag	gactttgatt	2520
agtgaactta	gcttaggagc	ctcgaatggg	gtaaggacag	ctatgcagtc	attggaaactg	2580
tcaataaaaat	ttttgcaaga	aattttcaata	tattttactac	ataaatcaat	agcgtctgat	2640
tctatatgtg	attcatcaag	aacaaagaaa	ccacttaag	atgagcttat	aactagtggga	2700
aaaacaaagt	aattttttaa	atcgagtttt	cgtaaatgtt	caagtgaaat	atttgagtca	2760
aaaagaaggg	tgttgcaatc	aacaattgct	cgggtaatgc	ttgtgaaaaat	tatatatttta	2820
ttggttattt	cctgaaatgt	ttttgttacc	ttttgaaatgt	cattcaagaa	ttttgaagaa	2880
tattcgtaca	tttgaatttc	gcctactttt	taccaaattt	tttaagaaag	atgccgttta	2940
cctctatata	ttagcataca	tttacacata	aaaacgcttt	cctgtaaatt	ttgtgataca	3000
taataataaa	ttattgttct	ttttaagtat	catacatttt	ttaagataat	atatcataaa	3060
tatcatgtta	taaaattaac	atgtaccaa	ttgtaaagcga	tttctcatta	tcgctatttg	3120
tttttatact	taggaggcat	tcttatggga	caagaagcac	ttggtttaat	tgaaaccgaa	3180
ggacttgtag	cttcaattga	agctgctgat	gcaatggtaa	aagctgctaa	tgttaaatta	3240
attggtc aag	aaaagattgg	tcatggatta	gtcacagtaa	tggttcgtgg	tgatgttggga	3300
gctgttaagg	cttcagttga	tgccggagta	caagctgccg	aaaatatagg	agaagtgtgtt	3360
tcgagttacg	taattcctcg	tcctcaatct	gaagttgata	agctcttacc	gc atcatggga	3420
gaataattga	taaaaaatta	aagcccttat	acagacggct	aggtacagaa	atctgtatta	3480

agagcctttat	tgttaagagc	ttttatagtc	aggaggaaaa	ataatgaatg	attttctgaa	3540
ttctactagt	actgttccag	aatttgttgg	tgctagcgaa	attggagata	ccattggaat	3600
ggtaattccg	agagttgatc	aacaactatt	agataaatta	cacgttacaa	aacaatacaa	3660
gacttttaggt	attttgagt	atcgtaactgg	tgctgggtcca	caaatatagg	caatggatga	3720
aggaattaa	gctactaaca	tggaaatgtat	tgatgttgaa	tggccacgtg	atactaaagg	3780
tggaggaggc	catggatgtt	taattatcat	cgggtggtgat	gacccctgcag	atgcacgcca	3840
agctattcgg	gttgcacttg	ataatcttca	tcgtacattt	ggtgacgttt	ataacgccaa	3900
agcgggtcac	cttgaattac	aattttacagc	tcgtgctgca	ggtgctgcac	atcttggatt	3960
aggatgcagtt	gaagggaaa	cattttgggtt	gattttgtgg	tgtecttccg	ggattgggtgt	4020
cgtgatggga	gataaggcct	taaagactgc	tgggtgttgaa	ccgcttaact	ttacttcacc	4080
aagtcatggt	acaagtttct	ctaacgaagg	ttgcctaact	attaccgggtg	actcaggagc	4140
tgttcgtcaa	gctgttatgg	ctggacgtga	agtaggatta	aagtatttgt	cacagtttgg	4200
tgaagaacca	gttaatgatt	tcccatcata	cattaagtag	atctagaagg	aggactactt	4260
tattatgaaa	cgtcaaaaac	gattttgaaga	actagaaaaa	cggccaattc	atcaagatac	4320
atttgttaaa	gaatggccag	aagaagggtt	cgttgcaatg	atggggccta	atgaccctaa	4380
gcctagtgt	aaagttgaaa	atggcaagat	cgtagagatg	gatggtaaaa	agctcgaaga	4440
ttttgatttg	attgacttgt	acattgctaa	gtatggaatc	aatattgaca	acgttgaaaa	4500
agttatgaat	atggattcta	ccaagattgc	acggatgctt	gttgatccta	atgtttctcg	4560
tgatgaaatt	attgaaatta	catcagcttt	gactcctgct	aaggctgaag	agatcatcag	4620
taagcttgat	tttgggtgaa	tgattatggc	tgtcaagaag	atgcgcccac	gtcgtaaagg	4680
tgacaaccag	tgtcacgtta	ccaatactgt	tgataacca	gttcaaatgt	ctgctgatgc	4740
tgtgatggc	gctcttcgtg	gattttccaga	acaagaaacc	acgacagctg	tggcacgtta	4800
tgcaccattc	aatgctattt	caattttaat	tgggtgcacaa	acaggctcgcc	ctgggtgtatt	4860
gacacaatgt	tctgttgaa	aagctactga	attgcaatta	ggatatgcgtg	gtttttaccgc	4920
atatgctgaa	accatttcag	tttacgggtac	tgatcgtgta	tttaccgatg	gtgatgatac	4980

tccatgggtct	aaaggcttct	tggcatcttg	ttatgcatca	cgtggtttga	agatgcgatt	5040
tacttcaggt	gccggttcag	aagttttgat	gggttatcca	gaaggtaagt	caatgcctta	5100
ccttgaagcg	cgttgtaatt	tacttactaa	ggcttcaggt	gttcaaggac	ttcaaaatgg	5160
tgccgtaagt	tgtattgaaa	ttcctgggtgc	tgttcctaata	ggatattcgtg	aagtctctcgg	5220
tgaaaacttg	ttatgtatga	tgtgtgacat	cgaatgtgct	tctggttgtg	accaagcata	5280
ctcacactcc	gatatgcggc	ggactgaacg	gtttattgggt	caattttattg	ccgggtactga	5340
ttatattnaac	tctgggttact	catcaactcc	taactacgat	aataccttcg	ctgggttcaaa	5400
cactgatgct	atggactacg	atgatatgta	tgttatggaa	cgtgacttgg	gtcaatatata	5460
tggatattcac	cctgttaagg	aagaaacccat	tattaaggca	cgtataaagg	ccgctaagac	5520
ccttcaagca	gtatttgaag	atcttggatt	accaaagatt	actgatgaag	aggtcgaagc	5580
agcaacgtat	gctaacaccc	atgatgacat	gccaaagcgg	gatatgggtg	cagatatgaa	5640
ggctgctcaa	gatatgatgg	atcgtggaat	tactgctatt	gatattatca	aggcattgta	5700
caaccacgga	tttaaagatg	tcgctgaagc	aattttgaac	cttcaaaaac	aaaaagttgt	5760
tggtgatttac	cttcaaacat	cttctatttt	tgataaagat	tggaaacgtca	cttctgctgt	5820
taacgacgga	aatgattatc	aaggaccagg	tactggatac	cgtctatatg	aagacaagga	5880
agaatgggat	cggattaaag	acttaccatt	cgccttgat	ccagaacatt	tggaaactgta	5940
gagaggaggt	aatctgttat	ggctgatatt	gatgaaaact	tattacgtaa	aatcgttaaa	6000
gaagttttta	gcgaaactaa	tcaaatcgat	actaagattg	actttgataa	aagtaatgat	6060
agtactgcaa	cagcaactca	agagggtgcaa	caaccaaata	gtaaagctgt	tccagaaaaag	6120
aaacttgact	ggttccaacc	agttggagaa	gcaaaacctg	gatattctaa	ggatgaagtt	6180
gtaattgcag	tcggctcctgc	attcgcaact	gttcttgata	agacagaaac	tggtatccct	6240
cataaagaag	tgttctgtca	agttattgct	ggtattgaag	aagaagggct	taaggcgcgg	6300
gtagttaaag	tttacccggag	ttcagatgta	gcattctgtg	ctgtccaagg	tgatcacctt	6360
tctggttcag	gaattgctat	tggtatccaa	tcaaaaggga	cgacagttat	tcacccaaaag	6420
gatcaagacc	ctcttggtaa	ccttgagtta	ttcccacaag	cgccagtact	tactcccga	6480

acttatcgtg	caattgggtaa	gaatgccgct	atgtatgcta	aggggtgaatc	tccagaacca	6540
gttccagcta	aaaacgatca	acttgcctcgt	attcactatc	aagctatttc	agcaattatg	6600
catattcgtg	aaactcacca	agttgtttgtt	ggtaagcctg	aagaagaaat	taaggttacg	6660
tttgattaaag	gaggcagaat	gatgagtga	gttgatgatt	tagtagcaaa	gatcatggct	6720
cagatgggaa	acagttcatt	tgctaatagc	tctacaggta	cttcaactgc	aagtactagt	6780
aaggaaatga	cagcagatga	ttacccactt	tatcaaaagc	accgtgattt	agtaaaaaaca	6840
ccaaaaggac	acaatcttga	tgacatcaat	ttacaaaaag	tagtaataaa	tcaagttgat	6900
cctaaggaat	tacggattac	accagaagca	ttgaaacttc	aaggtgaaat	tgcagctaata	6960
gctggccgtc	cagctattca	aaagaatctt	caacgagctg	cagaattaac	acgagtacct	7020
gacgaacggg	ttcttgaaat	gtatgatgca	ttgcgtcctt	tccgttcac	taagcaagaa	7080
ttattgaaca	ttgcaaagga	attacgggac	aagtatgacg	ctaattgtttg	cgcagcatgg	7140
tttgaagaag	ctgctgatta	ttatgaaagt	cgtaagaagc	taaagggcga	taactaagct	7200
ttttagtcag	agtagggagt	tttatgtatg	gcaactgaaa	aagtaattgg	tgttgatatt	7260
gggaattctt	ccactgaagt	tgcattggca	gatgtaagcg	atagtgggca	agttcacttt	7320
attaactctg	gtattgctcc	tactactggg	attaaaggta	ctaagcagaa	tctagttgga	7380
attagggatt	caattactca	agttctgaat	aaatctaate	tgacaatcga	tgatattgat	7440
ttaatttcgaa	tcaatgaagc	cacgccagta	attgggtgatg	ttgcaatgga	aactattaca	7500
gaaacagttg	taacagaatc	aacaatgatt	gggcataatc	ctaatacacc	aggtgggtata	7560
ggaacagggg	ctgggataac	agttcgtttg	cttgatctct	taaagaaaac	tgataaaaagc	7620
aaaaattata	ttgttgtagt	tcctaaggat	attgattttg	aagacgttgc	taaaccttate	7680
aatgcttatg	ttgcctctgg	ttataaaaata	acagcagcaa	ttctaagaaa	cgatgatggg	7740
gttttagttg	ataatcgggt	aaatcataaa	attccgattg	tcgatgaagt	tgctatgatt	7800
gacaaagttc	cgttaaataat	gctggcagct	gtagaagtgg	ctggccctgg	acaagtaatt	7860
tcacaacttt	caaaccgta	tggatatcgt	accttatttg	gactaactcc	agaagagact	7920
aagaatatgg	ttccagtttc	tcgagcgctt	attggaaatc	gttcggctgt	tgttattaaag	7980

a c t c c a g c t g	g g g a t g t t a a	a g c g c g a g t a	a t t c c a g c a g	g t a a a a t c a t	a a t t a a t g g t	8040
g a t a c t g g a a	a a g a a g a a g t	t g g a g t t t c t	g a a g g t g c t g	a c g c c a t t a t	g a a a a a g g t t	8100
t c t a g t t t c c	g c c a t a t t a a	c a a t a t a a c t	g g t g a g t c t g	g a a c c a a t g t	t g g a g g a a t g	8160
t t g g a a a a t g	t t c g t c a a a c	a a t g g c a g a t	c t t a c a g g a a	a g a a a a a t g a	t g a a a t t g c t	8220
a t t c a a g a t t	t a c t t g c t g t	t g a t a c t c a a	g t a c c a g t t g	a a g t t c g a g g	c g g t c t a g c t	8280
g g t g a a t t c t	c a a a t g a a t c	a g c a g t t g g g	a t c g c a g c a a	t g g t t a a g t c	a g a t c a t c t t	8340
c a a a t g g a a g	t t a t t g c t a a	a c t t a t t g a a	a a a g a a t t t a	a t a c a a a g g t	t g a a a t t g g t	8400
g g t g c t g a a g	t t g a a t c t g c	a a t t c g t g g a	g c a t t a a c a a	c t c c a g g a a c	a g a t a a g c c a	8460
a t e g c a a t c c	t t g a t t t a g g	t g c t g g c t c a	a c a g a t g c t t	c a a t c a t t a a	t a a a g a a a a t	8520
a a t a c a g t t g	c a a t t c a c t t	a g c t g g t g c t	g g t g a t a t g g	t a a c g a t g a t	t a t t a a t t c t	8580
g a a t t a g g a t	t g a a t g a t a t	t c a t c t t g c a	g a a g a c a t c a	a a c g c t a c c c	a t t a g c a a a g	8640
g t a g a a a a c c	t t t t t c a a a t	t c g a c a t g a g	g a t g g t t c g g	t t c a a t t c t t	t a a a g a t c c g	8700
c t t c c a t c a t	c a c t g t t t g c	c a a a g t t g t a	g t a a t t a a a c	c a g a t g g a t a	c g a a c c a g t a	8760
a c t g g g a a t c	c a a g c a t t g a	a a a a a t t a a a	t t a g t g c g t c	a a a g t g c a a a	g a a a c g a g t a	8820
t t t g t t a c g a	a c g c t t t a c g	g g c a c t t a a g	t a t g t t a g t c	c a a c t g g a a a	t a t t c g t g a t	8880
a t t c c g t t t g	t t g t a a t t g t	c g g t g g t t c a	g c c t t a g a c t	t t g a a a t t c c	a c a a c t t g t t	8940
a c a g a t g a a t	t a g c a c a c t t	t a a t t t a g t t	g c t g g t c g a g	g a a a t g t t c g	t g g a g t t g a a	9000
g g a c c a c g a a	a t g c c g t t g c	a a c t g g a t t g	a t t t t a a g g t	a t g g c g a a g a	a a g a a g g a a g	9060
c g t t a t g a a c	a a c g a t g a t t	c a c a a c g t c c	c t c g a t t g t c	g t c g g a c t a g	a a a a t g g a a t	9120
a a c g a t t c c a	g a t a g t g t c a	a g c c a c t t t t	t t a t g g a a t t	g a a g a a g a a c	a g a t c c c a g t	9180
c t c a g t t c g t	a a a a t c a a t a	t a a a t g a t a c	t g t t g a a a g a	g c a t a c c a a t	c a g c t c t t g c	9240
a t c a a g g c t a	t c t g t a g g a a	t t g c t t t t g a	a g g a g a t c a t	t t t a t t g t t c	a c t a t a a g a a	9300
c t t a a a a g a a	a a t c a g c c t t	t a t t t g a t a t	g a c a a t c a a t	g a t a a a a a g c	a a t t a c g a a t	9360
t t t a g g a g c a	a a t g c a g c g a	g a t t a g t a a a	a g g a a t c c c t	t t t a a g g a a a	t g g c a a a c a g	9420
g t g a t t t a a t	t a t g a a g t c t	t t g g g c t a t g	t a g a a t g t a a	t g g a t t a t c t	g g c g c t a t t g	9480

tg gctgctga	caggatgcta	aaaactgacag	atggtgaact	tagtagtatt	caaaaatacga	9540
aaggtaatgg	atgggtcacc	ttacaagttt	ctgggtgaact	atcagctata	actgtttgcgg	9600
ttcaagctgt	aaaagactat	ttacctgatg	tatatgtaac	gtcagcgata	atagggcgctc	9660
cagcaatagg	gttgaactcc	ttggggcaaaa	cagatttatt	gcaacc aaat	ccagaaaagc	9720
agcaaaaatat	tgctgaaaag	gaaaagggttg	ctgaaccatc	ttcaattaaa	gaagagatag	9780
tacagaatag	tgaaaattct	gctgaaccta	gtgttcaaac	tgagcgatca	ttagagggca	9840
aagatgaaat	cgaagcttcg	gattcgtcta	atgataaaca	agataccaac	tctaattgata	9900
atgaagtcac	atgcaatatg	tgtggagatc	caaaatgtcc	acggaaatta	ggagaaccgc	9960
ataagaagtg	tatccattac	aatgaattaa	agaaaaagta	ggaggaaata	actatgaata	10020
acgcttttagg	aatgattgaa	acacgcggat	tagttgcac	tattgaagct	gctgatcaaa	10080
tggtaaaggc	tgctaattgt	acattaaactg	gccaaagaaa	gattggtagt	ggattggtaa	10140
ctgttatgat	tcgtgggtgat	gttgggtgctg	taaaggctgc	cgttgatgct	ggtgtacaag	10200
ctgctgaagg	tgctggcgaa	gttgtatcgt	cttacgtaat	tcctcgtcca	catgaagaag	10260
ttgaaaagat	tttaccagggt	ggatcagatt	cagacgctga	atagaaaatt	ttaataaaaa	10320
ggaagattac	gtatggatga	agaacattta	agaacactta	tccggacgat	tgttagagaa	10380
acacttaatc	ctaacctagt	tccaattgggt	gtttcaaatc	accatgtaca	tttgacggaa	10440
gaagactttc	aaaagctatt	ccctgggtcaa	aagattgaaa	tgctaaagaa	acttcgtcaa	10500
catgcggact	ttgctgc aaa	gcaaactgtt	gatactgacg	ggcccaaagg	caccattgaa	10560
catgttcgtc	taatggggcc	ataccgttca	cactcacagg	tagaaattgc	ccgttcagaa	10620
aaactttacac	taggaattga	tgctccaatt	agaatgtctg	gtgatcttga	tggcaccct	10680
tcaattaagg	ttcggtcacc	atatgcggaa	attgaaattc	aagggtgtaat	tgttgcaaaag	10740
cgacacatcc	acatgagttt	agaagatgcc	aagcgccttg	gcgtaaagct	cgggtgattca	10800
atgcaggttg	aagtagatgg	cgatgggtgga	cgtaaaacca	tttttgatga	cgtagttgct	10860
cgcctcgtg	aagactttgt	ccttgaaatg	catattgata	ctgatgaagc	caatgcagct	10920
aatgtcggac	taggtaataa	ttctttcggga	aaagttatta	tcaagaagaa	aaactaactt	10980

tttgagaaac	taataagggg	gtgaatagat	ggataacctt	gtacaacagg	ttatgcaacg	11040
attagaagaa	cgaaagcata	cgagcgttga	agttactttt	aatcatcaag	ttgccccgcc	11100
tagtgaacag	atTTTTttga	gaaacggaaa	agttattcta	aaagatatTT	cgattgagtt	11160
aataacggac	ttatatTTcaa	tggaaaagac	taacgcttgg	gttaaatggg	tgttagaagg	11220
aattagctat	gatgtttaaT	tttactTTTT	aattaatgaa	cagatggTTa	atTTttattcc	11280
acggatgatg	atTTTTggact	ggccgatctt	gtttgttgta	aataacgaat	cgccagtaat	11340
tgccagttat	aatcggatta	ttaccagaga	agagatagct	gctaaaccag	ataaatcgat	11400
tcttgttaga	tatcaaaagc	aacatattac	agatgaagca	cttgatatct	gtaactataa	11460
aaaaattaaa	ataaagatta	ggactgaaga	aaattgtata	tggcgagagt	agtaggtagt	11520
gttgttgcaa	cccaaaagga	tccatcctta	gttggaagaa	aactaatgat	agttcaacag	11580
attaatttccg	accaacaacc	agttcgatTT	gaacaagtTg	ccgctgatac	agtaaattgct	11640
gggattggTg	ataatgtatt	aatagttcgt	ggtgctggTg	caagacgtgc	tgataaagag	11700
cgtgatgagg	atcaagtaag	ggacgttTaat	gactgtacga	tagttggaat	aattgaccgt	11760
tttgataagt	agtgtgcatt	ggaggcatca	aaatggctat	ttacacaaaa	ggtggtgaca	11820
agggagaaac	aagttttattc	gatggaaacga	gggtacctaa	ggattcatta	cgagttgaaa	11880
cttatggaaac	ttttgatgaa	ttaaacgcta	atattagttt	ggcagataaa	ttctgtgaaa	11940
gtaaacgtaa	taagaagctt	ttacaagaga	tccaatatata	aatgttttttc	cttcaaggTg	12000
agatagcgac	agaaaaaacgg	cagtattttta	ctgataaaag	taagattatt	actgatgaag	12060
atactcgaaa	acttgaaaag	gttattgatg	aatatacatc	aaaactgccca	cctgttcata	12120
gtttttatctt	acctggttcgg	agtactgcgg	gtgcacaact	tcataatttgT	cgaacaatct	12180
gtcgtcgtgc	agagcgacta	tttgtgcggc	tatcaaagaa	tgtaaaatttt	cgtccagagc	12240
tagaaaagata	tattaatcgt	ttgtcggatt	ttttatatat	tgtagcgcgt	gatgaagact	12300
atgaagatttt	attaaatagt	gtaactgatg	acgtgttTaaa	aatTTtacaaa	cgttatcaag	12360
aagaaaagga	tgtgcgtTtaa	gaatgaacga	ggaacaaatt	agtaagattg	ttgaaaacgt	12420
aatcaagaat	aatgcTTtcta	aaaatctatt	tgatecggcac	aaaaatggaaa	aagtaatcga	12480

tgcggctgta	gctcgtgcta	atgaattggg	tgttggagta	acaattgcta	ttatgaaagc	12540
tgatcaagta	ttgcaaataga	gctaccatat	gccaaatgct	aatttagtaa	gttgtaacttt	12600
agctcctaaa	aaggcatggg	cagcattagc	aatgaaggaa	cctaccaagg	atattagtaa	12660
ggatatccaa	ccagggtgccg	gattatatca	aatggaaaca	atgcttgatg	gtaagttagc	12720
atctttttgca	ggtgggtattc	cattgaagat	taacgatgaa	attattggag	cgattgggtgt	12780
tagtggtgga	ttggttgaag	aagatcaatc	aatttgtgaa	gctgctgttg	cagaatttttt	12840
gaaggagagt	aagtagatat	gcagattaat	gatattgaaa	gtgctgtacg	caaaatttctt	12900
gccgaagaac	tagataatgc	cagctcttca	agtgc aaacg	ttgcagctac	tactgataat	12960
ggteatcgcg	gaattttcac	taatgtcaat	gatgcaattg	ctgctgcaaa	agctgctcaa	13020
gaaatatatc	gggataagcc	aattgctgtt	cgccaacaag	tgattgatgc	cattaaggaa	13080
ggattccgcc	catatatatga	aaaaatggct	aaagatatca	aagaagaaac	aggaatggga	13140
acagtagagg	ccaaaattgc	taagttaaac	aatgccttgt	acaacactcc	tgggtcccag	13200
attcttgaaac	cagttgtaga	aaacggtgac	ggtgggatgg	ttatgtatga	acggttacca	13260
tatgggtgtta	ttgggtgcggg	tggcccaagt	acaaaacctt	cagaaactgt	aattgctaata	13320
gcgatcatga	tgcttgccgg	tggtaatact	ctttactttg	gtgctcacc	tggcgcaaaag	13380
aatgttactc	gctggacaat	tgaaaagatg	aacgatttta	ttgcagatgc	aacaggcctt	13440
cataatttag	ttgtaagtat	tgaaacacca	acaattgaat	cagttcaaca	aatgatgaag	13500
caccccgaca	ttgcaatggt	agcagtaact	ggtggccag	ctgttggttca	ccaagcaatg	13560
accagtggtta	agaaagcggg	tgggtgctgg	cctggtaatc	ctcctgcaat	ggttgatgct	13620
actgctgata	ttgatttagc	tgctcataat	atcattacat	ctgcttcatt	tgataatgat	13680
attttatgta	ctgctgaaaa	ggaagtagtt	gcagaaagta	gcattaaaga	tgaatttaatt	13740
cgtaagatgc	aagatgaagg	tgcctttgtta	gttaaccgtg	aacaagccga	taaattagct	13800
gatatgtgta	tccaagaaaa	tgggtgctcct	gategtaaat	ttgttggtaa	ggatgcaact	13860
tatatcttag	accaagctaa	tattccttac	acaggeccacc	cagttgaaat	tatttgtgaa	13920
cttcctaagg	aacatccatt	agtaatgact	gaaatgttaa	tgccaatttt	accagttgtt	13980

tcttgtccaa	catttgatga	tgttttgaag	actgctgttg	aagttgaaaa	aggtaaccat	14040
cacacagcta	ctattcattc	caataaccctt	aagcatatta	ataatgctgc	tcaccggatg	14100
caatgttcaa	tctttgttgt	taatggccca	tcctatgttg	gtacagggtgt	tgcagataat	14160
ggagctcact	cagggtgcttc	agcattaaca	attgctacgc	caactgggtga	aggaacatgt	14220
actgcacgaa	catttactcg	tcggggttcgt	ttgaactcac	cacaaggatt	ctcagtacgt	14280
aactggatatt	aatgggaggc	ataattccaa	tggaaaaata	tagtatgccca	acccggattt	14340
attcgggaac	agatagtttg	aaagaactag	agacacttaa	taatgaacgt	attttattag	14400
tctgtgattc	tttcttgccct	ggtagtgata	ccttaaaaaga	aattgagagt	cacattaagg	14460
ataataataa	gtgtgaaatt	ttctctgatg	ttgtccccga	tcctccacta	gataagatta	14520
tggaaggggt	tcaacaattc	cttaaacctta	aaccaacaat	tgtgattgggt	atcgggtggcg	14580
gacacagcttt	ggatactgggt	aagggaattc	gtttcttttg	tgaaaagtgtg	ggcaagtgcga	14640
agatcaatga	atatattgct	attccaacaa	cgagtgggtac	tggttcagaa	gttacgaata	14700
ctgcggttat	ttctgatacg	aaagaacatc	gtaaaaattcc	tatttttggaa	gattatttga	14760
cacctgattg	tgctttacta	gacctaatac	tagttatgac	tgctcctaag	agtgtaaactg	14820
catattcagg	aatggatggt	ttaacacatg	cacttgaatc	tttggttgct	aaggatgcaa	14880
atttattcac	agttgcatta	tcagaagaag	caattgatgc	cgttattaaa	catttagttg	14940
agtgttatcg	tcacggcgat	aatgtggatg	ctcgtaagat	tgttcatgaa	gcatacaata	15000
ttgccgggaac	tgcatttaat	attgctggat	tagggatttg	ccactcaatt	gcgcataaat	15060
tgggagctaa	tttccacggt	ccccatgggt	tagcaaatac	aatgctcttg	ccatatgtta	15120
tcgcataata	tgctgaacat	agtgaagagg	cattgcataa	gtttgcaatt	gctgctaaga	15180
aagctggaat	tgctgctcct	ggagtaggcg	atcgtcttgc	agtaaagcga	ctaattgcta	15240
aaattagggga	aatggcacga	caaatgaatt	gtccaatgac	tcttcaagca	ttcgggtgttg	15300
atcctgctaa	agctgaagaa	ttagctgata	ctgtttgttgc	aaatgcgaag	aaagatgcaa	15360
cattccctgg	caatccagtt	gttccttcag	ataatgatct	gaagatgggt	tacgaagcaa	15420
taattcgtta	atthagttta	tttggagtga	tttgatgtca	aaaaaaatac	ttgcaattaa	15480

ttctggttagt	tcatcaatta	agttc aaact	ttacttgatg	ccagaggaga	aactattaat	15540
tagtggttct	gctgaaaatc	ttggttcttc	gacaagtcag	ctttcatata	aaactgataa	15600
aactaacgag	acaagacaaa	tcccttttaa	aaaccactca	gaggcaattg	accatattat	15660
tgatgtttta	atgtcttagtg	gggttgttaa	ggataagtc	gaaatttatg	gtgttggtca	15720
ccggatttct	catggcgga	gttactatac	tcatgcagtg	gcagtcactc	cagaagttga	15780
aaaacggatt	gatgaattga	agggtgttattc	acctctgcat	aatccaaatg	gactagcagg	15840
gataaaaagcc	tttgaaaagt	ttcttccaga	tgccaaggaa	gtagttactt	tcgataattc	15900
atttcatcat	acaatcccta	agaaaagctta	tatgtatgct	ttgccatatg	agttttatga	15960
aaagtatcaa	attagggcgt	acgggttcca	tgccecttca	cateagtatg	tgtcagaaaa	16020
agcgcgtgaa	cttttttggt	aagaaaagac	tcgtcgtatg	atcacgtgtc	atttgggaaa	16080
tggatcaagc	gtttcggcga	tcttagatgg	aaagtcggtt	aactcttcaa	tgggctttac	16140
tccgttagca	ggtgtagtga	tgggaacgcg	atgtggagat	attgatccag	aaattattcc	16200
ttttcttgaa	gaagaactca	atattgattc	acatgaaatg	cgtcgaataa	tgaatgaaga	16260
ctcagggctt	aaaggcttat	ctgggatttc	taatgatgaa	cgtgagattg	aaagtgcggc	16320
taaaaacggt	aacgaacggg	cacaattagc	tttagatgta	tttgtaacatt	caattcaaca	16380
atataattgga	gcataataca	cggatcttga	tggattggat	acattagtat	ttacagccgg	16440
aattggtgaa	catgctgctt	atattagaag	tcagatctgt	aagaatttag	actatcttgg	16500
agtcaaaatt	gacgaagaga	aaaataaaaa	taatgagcta	agcattgaag	cacctgatat	16560
taaggttaaa	atagctgtta	ttccaactaa	cgaagaaata	attattgccc	gtgatgtaat	16620
gaatgtaact	cagcaataaa	atggggatga	tactatggct	aggcaggata	tcaaacggac	16680
aattcaagaa	tatgttcagg	gtaaacaggt	aacattagca	catatcgttg	ctaaccctac	16740
gccagacatt	tatgagaaat	tagggataca	aactcctaaa	aatgcgcttg	gtattttgac	16800
aataacgcc	agtgaagcct	caattatcgc	tggggatatt	gctacaaagt	cgagttaatgt	16860
tactctaggg	ttcattgate	gatttagtgg	ctcggttgta	attgtgggag	aagtttctga	16920
aattgaatca	gctttgcgtc	atgtggttga	taagctacaa	acgttactgg	ggtttgatgt	16980

t c c t g a a a t t	a c a c g a a c a t	a a c a t t a g a a	g t g t a t t c a t	t t a c g c t a a c	g t g t a g t a g a	17040
t g a a t a c a c t	t t t t a g a a a g	g a g g g a g a t g	c a a t a t g g c g	a a t c a t c a g c	g a a t t c t a g c	17100
g t t t g a a a a t	g g a t t t a a t t	t t c g a g a t c t	t g g t g g t t a t	a g a a c t a t t g	a t g g c g a a a g	17160
t c t g a a a t g g	a a t a a t c t t g	t t c g t t c t g c	g c a t c t c t c c	t a t t t t a c a c	a t a a t g a g c a	17220
a a g a a a a c t t	t a t g g a t a t g	g t a t t a g g a c	a a t t a t t g a c	t t t c g t t c a a	c t t c c g a a g t	17280
a g c t t t t t a t	c c c g a c c a a t	t a a c a t c a t t	g a t g a a t t a t	a t t c g g a t a c	c g g t c t t t g a	17340
g a a t g a c c t t	a c t g a a a g t a	a t a t t a g t a t	t g c t g a a g c a	c g a a a a a g t t	t t t c a a a g g a	17400
t c c a c a a g c g	g g t t t t a a t c	g c a t g a t g g a	a g t a t a t t g t	c a a t t t g t c a	c t g a t g a g a a	17460
a g c a c a a g a a	g c a t t t c a c a	c c t t t a t t a a	a a a a t t a t g c	c t a c a t t c a g	c g c a g g g t g g	17520
t g t t t t a t t t	c a t t g c t c t g	c g g g g a a a g a	c c g t a c t g g t	t t a g g a g c a a	t t t a t t t a c t	17580
a a g t c t t c t a	c a a g t t c c a g	t a g a t a t a a t	t t a t c a a g a t	t a t a t t t t a a	c t a a t a a a g c	17640
a t c a a c a a a a	a g g a t a a a a g	a a c g a t t a c g	t t a t g c t a t a	a a a a a t a a c c	t a g g t g a t a a	17700
t t a t c t t c a c	t c a a t t t a c g	a t c t t t c a a c	a g c a a a t a g g	t g t t a t t a t g	a t c a a g c a a t	17760
c t c t c t t a t t	a a t a a t a a a t	a t g g t g g a a t	g a c c t c t t a c	t t a a a a g a t g	t g t t a c a a a t	17820
c a g t g a t t c a	a t g g t t g a a c	a a c t a a g a t a	c t t a t a t c t g	a c a a a g t g a a	t t t a g g c t t a	17880
g t a a a a a t t a	a a a g c c a t t g	a t a t a a t a a t	g g c t a a a a a a	g a g g c t a g a a	t t g a a t a g c c	17940
t c t t t a a c a t	a c a t a a t t c t	t a t a g g t g g a	t g g t a a t a a t	g a c a a c t t t t	t t t t a a t t c g	18000
t c a c g g g g a a	a c c t a t g c t a	a t c g a t t a a a	t t a t a t c c a a	g g t a c a t t a a	a t g a t a g a t t	18060
a a c a a g t c t g	a c c a a a c a g g	g a a t g c t g g a	a g c a g c g a a t	t a t c a a a a a t	t g t t t g a t a a	18120
t a a t c a a a t t	g a t t a t g t c t	a t a c a a g t c c	g t t a a g g c g a	g c a g t a a a a a	c g g g g c a a a t	18180
a a t t t g t g c t	a c g a c t a a t a	t t a a g t t g c a	g g t t g a t g a a	c g t c t a g c a g	a a a t a t c t t a	18240
c g g t a a a t g g	a a t g g g g c a g	a t a t t a g t a a	a t t a a a g c a a	c a g t a t t c g a	t g t a t t t t g a	18300
t g t t g a a a c g	a a t g a c g t g c	g a c c a c a t t c	a a t t t t g a t a	a a t c a a g g c g	a a a a c t t t g a	18360
a c a t g c t c g t	g c a c g a a t a t	g g t c a t t t t t	a t t g g a t a c t	t c t t a t a a g t	a t c c a c a a c a	18420
a a a t a t t t t a	a t a a t t a c a c	a t g g c t g g a t	a a t a a a a a a t	a t c a t t t c g t	t g t g t c t t g a	18480

gaatatattgat	gggacttcat	tcaaaaaatcc	caataatcta	agtatttagta	agatccaatt	18540
gaatccggca	ttaaagcagc	aacgaatatg	ttattataat	cgaccgttca	tagggacgat	18600
gatatattatga	gtcttattac	aattcttttg	atatttgtgg	gacttaatat	tgatacgttt	18660
attgcactat	tatttctttt	acgaaactat	aattaccggt	taccgattat	tggctttgga	18720
gtagcaacgc	ttattttatg	gacttttggg	gtaatttttag	gaaaaggggct	agcatttcta	18780
tttccagatt	ggattacagg	atttatgggc	attattttaa	tctttatagc	gctttttgaa	18840
caggatgacg	aaaaaaagac	aactaataca	agttttctct	cattacttct	gttttgttta	18900
agccttgggtg	gagataatct	tgctgtttat	attccattgg	tggttaacct	tagttggagt	18960
cagattatat	acgtaggaat	aatttttgaa	atttgttcag	tcctattaat	tctattagga	19020
aaacaatttg	ttttaataaa	acctgtggca	tatttgttgg	aaaaatatgg	taattttgga	19080
agcaaaaattg	tttatgtttt	agcgggttta	tataattattt	ggaaatagtc	tttaattaat	19140
caccttatta	gaatttttaa	ttaagttcag	caactaattt	atcgatatta	atattttcaa	19200
ctgccgaaac	aggaattacc	ttctttaccc	cagcgcttaa	cagaagattc	ttggaatatt	19260
caatgtcggc	agggctctttt	acaagatcaa	tctttgtaac	tacacctaaa	gtaggtttctg	19320
aaaacattga	acagaagcca	gccgggaaaa	caagtcgttt	gtcaaccgca	ctttgtaata	19380
aaacaactat	atcagcatcc	atcgaggtta	cacgtaacgt	gtcatcata	ttatgatgct	19440
ccatatattc	tcctgggtgtg	tcaataatat	ttgatgaaaa	ttcaattgct	tgtgttttat	19500
tatattttaat	ttgttgattt	tctaatcggt	gagtaagggt	tgttttacca	catgctattg	19560
ctccgataaa	catagtctgt	ttcataatta	aatacctcca	ccaattctac	aaaaatatac	19620
tatttatctg	tattataata	aaagcgggta	cacatagcca	tagataaaaa	aagattagtg	19680
aggaattata	gatgctaaca	gcacatgtag	tttatgccac	gatgactggg	aataatgagg	19740
aagtagcaaa	cattgtatgt	gatagtttga	ctaattttaa	tgttaaagtg	acagagtcctg	19800
agatatcaca	aactgatgta	gcagatttta	tgaaggctga	cattttagtt	gtttgtgctt	19860

<210> 54
 <211> 708
 <212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 54

atgcatggat ttattggcga attttttggc accatggttt taatcctatt aggagcagga	60
tgttgtgctg gtaatagttt gaataaaaca tatgggaaac aaagtggctg gtggttttatc	120
tgtatttcat ggggcttagc agttacaatg ggagtttatg ttgcaggatt tctgggttca	180
ttagggcact taaatcccgc tgtaacaatt ccttttgcta tttttggctt attcccatgg	240
agtaacgtta taccttactt acttgggtcaa tttcttgggtg cgtttgttgg tgcagtatta	300
gtaattattc aattctatcc acaattttaa gcaaccccaa atgaagaaga aggaaataat	360
gttgggtatit ttgctactcg tccagcgata aatagtccaa tttttaactt tttctcagaa	420
gtgattgcga cctttgcatt tattttcatt ttattaaatc ttggcaactt tacacaggga	480
ttgaagccat ttatcgtagg aatgggttatt gcagttgttg gtacatgtct cgggacaact	540
actggctttg cattaaaccc agctcgtgat tggtcaccac gtttagcata tactattttg	600
ccaattccta ataagggtgt ttcagaatgg tggtatgcat gggttccaat gtgtggccca	660
attgttgggg gccttcttgc ttgtgcttta caaacggcac tagtttag	708

<210> 55

<211> 834

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 55

atgaaaaaag aattttttaa aagtagtaat gaacaattaa aaaaaatttc cgagattggt	60
aatggggata agcctttacg taaagttacg gctgatgaaa agctaaaggc cgggtgtagat	120
ttaggaactt cttcaattgt tttaacagtg ctggattcca aagataagat tgtatacgga	180
gcgtatgaat atgaccatgc agttcaagat ggtattgtag ttaatttcat ggaatcagtt	240
aatattttta gacgcttaaa agaaaaagct gagaaagtat taggacgtga acttaaaacg	300
gcatgtgggtg ctattccacc gaagacagga gagaagagtg ccaaagtggc tgctaattgtt	360
atcgaagaga caggcttgct ttgtacaggt gttgaagatg aaccgacagc agctgcgaag	420
ttcttaagat tgtcaaattgg tacagttgta gatattggag gaggaacaac tgggatttagt	480

at t t t t t a a a g	a t a a c a a g c t	c a t c c a t g t t	a t t g a t g a a g	c a a c a g g c g g	a t t t c a t a t g	540
a c g c t t g t t c	t t g g a g g a a g	a t a t a a a a t a	a a a a a t g a t g	a a g c a g a a a a	a t t a a a g c g t	600
a a c a a g a a t a	a a g a a t c t g a	a g t a t a t g c t	g t t a t t a a a c	c t g t a g t t g a	g a a a a t g g c a	660
g c a a t t g t t c	a a a a t a t g g g	a g t a g a a a t t	a t t g a t c c a g	t a a t a g t g g t	g g g a g g t g c a	720
a c t a a c t t t a	c t g a a t t t a c	a a c a a c c t t t	a g t a a a g a t t	t a a a g c g t a a	a g t t t a t a a a	780
c c g c t t t a t c	c t c a a t t t g t	t a c g c c a c t a	g g g a t t g c a a	t g t t t g a t g a	t t a g	834

<210> 56
 <211> 1080
 <212> DNA
 <213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 56	
a t g t a c g a a t	a t t c t t c a a a
a t t c t t g a a t	g a c a t t c a a a
a g g t a a c a a a	a a c a t t t c a g
60	
g a a a t a a c c a	a t a a t a a t a t
a a t t t t c a c a	a g c a t t a c c g
g a g c a a t t g t	t g a t t g c a a c
120	
a c c c t t c t t t	t t g a c t c a a a
t a t t t c a c t t	g a a c a t t t a c
g a a a a c t c g a	t t t t a a a a a t
180	
t a c t t t g t t t	t t c c a c t a g t
t a t a a g c t c a	t c t t t a a g t g
g t t t c t t t g t	t c t t g a t g a a
240	
t c a c a t a t a g	a a t c a g a c g c
t a t t g a t t t a	t g t a g t a a a t
a t a t t g a a a t	t t c t t g c a a a
300	
a a t t t t a t t g	a c a g t t c c a a
t g a c t g c a t a	g c t g t c c t t a
c c c c a t t c g a	g g c t c c t a a g
360	
c t a a g t t c a c	t a a t c a a a g t
c c t t a a t g g g	a t t t t g a a t a
t t t c t g g a g a	t g a t t c a a t a
420	
g c t a a c g t t a	c t a a t c c t c c
t a t t c t t a a t	a a c a g a a a t g
a t g g t a c t c t	a a g t g a t a t t
480	
g a a a a a a a t a	t a a c c a t g g c
g c t t a a a t a c	a t t a a t t c c a
a t t t a g a a a a	a t c g c t t a c t
540	
t t a g a a a a c g	t t t c t c a a a g
g a t t t a t c t c	t c a c c a t c a t
a c t t a a g t c g	a a t c t t t a a a
600	
a a t t a t t t t a	a t g a c a a t t t
t a t t a a c t a t	a t a a a t c t a c
a a a a a a t t g c	a c t t g c t c a a
660	
g a a a a a t t a a	t t t t t t c a a a
t a c a c c a a a t t	a a t a a a t t g g
c t c a t c a a g t	t g g t t t t t c a
720	
c a g a c a a g t t	a c t t t a c t a a
a a t t t t c a a g	c a a a a a g t a g
g a a t g a c a c c	a t c a a a g t a t
780	
c g a a a a t a t a	a t t c c g c a a t
a a a g a a a a t c	t a t a c t a t t c
c a a g a g a t t t	a c a a t g g c g c
840	
t c a a a t a a g t	c c g t t t a t g a
a a t c t c a a a a	g a t t t t t t c a
a t a a a a a t g a	t a t t t c c t t t
900	
a a a g c c c g t g	a t t t a a a t g g
g t a t c c a t a t	a t c t a t t c a a
t a a a t g a t c t	g a a t g a t g t t
960	

agtaataaag cagggttgggt ctatacagta gattgttctc aacctattat tccagctagt 1020

gagattaatg tatttgatcg ttcagtaatt caatggattt ataactgaaaa aattatttaa 1080

<210> 57

<211> 282

<212> DNA

<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 57

atgggacaag aagcacttgg ttttaattgaa accgaaggac ttgtagcttc aattgaagct 60

gctgatgcaa tggtaaaagc tgctaattgtt aaattaattg gtcaagaaaa gattgggcat 120

ggattagtea cagtaatggg tcgtgggtgat gttggagctg ttaaggcttc agttgatgcc 180

ggagtacaag ctgccgaaaa tattggagaa gttgtttcga gttacgtaat tctcgtcct 240

caatctgaag ttgataagct cttaccgcat catggagaat aa 282

<210> 58

<211> 717

<212> DNA

<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 58

atgaatgatt ttctgaattc tactagtact gttccagaat ttgttgggtgc tagcgaaatt 60

ggagatacca ttggaatggg aattccgaga gttgatcaac aactattaga taaattacac 120

gttacaaaac aatacaagac tttaggtatt ttgagtgate gtactgggtgc tgggtccacaa 180

attatggcaa tggatgaagg aattaaggct actaacatgg aatgtattga tgttgaatgg 240

ccacgtgata ctaaagggtgg aggaggccat ggatgtttaa ttatcatcgg tggatgatgat 300

cctgcagatg cacgccaaagc tattcggggt gcacttgata atcttcacgc tacatttggg 360

gacgtttata acgccaaagc gggtcacctt gaattacaat ttacagctcg tgctgcagg 420

gctgcacatc ttggattagg tgcagttgaa gggaaagcat ttgggttgat ttgtggttgt 480

ccttcgggga ttgggtgtcgt gatgggagat aaggctttaa agactgctgg tgttgaaccg 540

cttaacttta cttcaccaag tcatgggtaca agtttctcta acgaagggtg cctaactatt 600

accggtgact caggagctgt tcgtcaagct gttatggctg gacgtgaagt aggattaaag 660

ttattgtcac agtttgggtga agaaccagtt aatgatttcc catcatacat taagtag	717
<210> 59	
<211> 570	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus reuteri	
<400> 59	
atgaagtctt tgggctatgt agaatgtaat ggattatctg gcgctattgt ggctgctgac	60
aggatgctaa aaactgcaga tgttgaactt agtagtattc aaaatacgaa aggtaatgga	120
tgggtcacct tacaagtttc tgggtgaacta tcagctataa ctgttgcggt tcaagctgta	180
aaagactatt tacctgatgt atatgtaacg tcagecgataa tagggcgctcc agcaataggg	240
ttgaactcct tggggcaaac agattttattg caaccaaaac cagaaaagca gcaaaatatt	300
gctgaaaagg aaaagggttgc tgaaccatct tcaattaaag aagagatagt acagaatagt	360
gaaaattctg ctgaacctag tgttcaaaact gagcgatcat tagagggcaa agatgaaac	420
gaagcttcgg attcgtctaa tgataaacaa gataccaact ctaatgataa tgaagtcaca	480
tgcaatatgt gtggagatcc aaaatgtcca cggaaaattag gagaaccgca taagaagtgt	540
atccattaca atgaattaaa gaaaaagtag	570

<210> 60	
<211> 291	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus reuteri	
<400> 60	
atgaataacg ctttaggaat gattgaaaca cgcggattag ttgcattctat tgaagctgct	60
gatcaaatgg taaaggctgc taatgtaaca ttaactggcc aagaaaagat tggtagtgga	120
ttggtaactg ttatgattcg tggatgatgtt ggtgctgtaa aggctgccgt tgatgctggt	180
gtacaagctg ctgaagggtgt cggcgaaagt gtatcgtctt acgtaattcc tcgtccacat	240
gaagaagttg aaaagatttt accagggtgga tcagattcag acgctgaata g	291

<210> 61
 <211> 645

<212> DNA

<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 61

```
atggatgaag aacatttaag aacacattatc cggacgattg ttagagaaac acttaatcct      60
aacctagttc caattggtgt ttcaaatcac catgtacatt tgacggaaga agactttcaa      120
aagctattcc ctggtcaaaa gattgaaatg ctaaagaaac ttcgtaaca tgcggacttt      180
gctgcaaagc aaactgttga tctgatcggg cccaaaggca ccattgaaca tgttcgtcta      240
atggggccat accgttcaca ctcacaggta gaaattgccc gttcagaaaa ctttacacta      300
ggaattgatg ctccaattag aatgtctggt gatcttgatg gcaccccttc aattaagggt      360
cggtcaccat atgcggaaat tgaaattcaa ggtgtaattg ttgcaaagcg acacatccac      420
atgagtttag aagatgccaa gcgctttggc gtaaagctcg gtgattcaat gcaggttgaa      480
gtagatggcg atggtggacg taaaaccatt tttgatgacg tagttgctcg ccctcgtgaa      540
gactttgtcc ttgaaatgca tattgatact gatgaagcca atgcagctaa tgtcggacta      600
ggtaataatt ctttcggaaa agttattatc aagaagaaaa actaa      645
```

<210> 62

<211> 504

<212> DNA

<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 62

```
atggataacc tagtacaaca ggttatgcaa cgattagaag aacgaaagca tacgagcgtt      60
gaagttactt ttaatcatca agttgccccg cctagtgaac agattttttt gagaaacgga      120
aaagttattc taaaagatat ttcgattgag ttaataacgg acttatattc aatggaaaag      180
actaacgcctt gggttaaatg ggtgttagaa ggaattagct atgatgttaa attttacttt      240
ttaattaatg aacagatggg taattttatt ccacggatga tgattttgga ctggccgac      300
ttgtttgttg taaataacga atcgccagta attgccagtt ataatcggat tattaccaga      360
gaagagatag ctgctaaacc agataaatcg attcctgtta gatatcaaaa gcaacatatt      420
acagatgaag cacttgatat ctgtaactat aaaaaaatta aaataaagat taggactgaa      480
gaaaattgta tatggcgaga gtag      504
```

<210> 63
<211> 273
<212> DNA
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 63
atggcgagag tagtaggtag tgttgttgca acccaaaagg atccatcctt agttggaaag 60
aaactaatga tagttcaaca gattaattcc gaccaacaac cagttcgatt tgaacaagtt 120
gccgctgata cagttaaattgc tgggattggg gataatgtat taatagttcg tggtgctggg 180
gcaagacgtg ctgataaaga gcgtgatgag gatcaagtaa gggacgttaa tgactgtacg 240
atagttggaa taattgaccg ttttgataag tag 273

<210> 64
<211> 609
<212> DNA
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 64
gtgtgcattg gaggcaccaa aatggctatt tacacaaaag gtggtgacaa gggagaaaca 60
agttttattcg atggaacgag ggtacctaac gattcattac gagttgaaac ttatggaaact 120
tttgatgaat taaacgctaa tattagtttg gcagataaat tctgtgaaag taaacgtaat 180
aagaagcttt tacaagagat cgaatataaa atgtttttcc ttcaagggtga gatagcgaca 240
gaaaaacggc agtatttttac tgataaaagt aagattatta ctgatgaaga tactcgaaaa 300
cttgaaaagg ttattgatga atatacatca aaactgccac ctgttcatag ttttatctta 360
cctggttcga gtactgcggg tgcacaaact catatttgtc gaacaatctg tcgtcgtgca 420
gagcgactat ttgtgcggct atcaaagaat gtaaaatttc gtccagagct agaaagatat 480
attaatcgtt tgtcggattt tttatatatt gtagcgcgtg atgaagacta tgaagattta 540
ttaaatagtg taactgatga cgtgttaaaa atttacaaac gttatcaaga agaaaaggat 600
gtgcgttaa 609

<210> 65
<211> 474

<212> DNA
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 65
atgaacgagg aacaaattag taagattggt gaaaaacgtaa tcaagaataa tgcttctaaa 60
aatctatttg atcggcacaa aatggaaaaa gtaatcgatg cggctgtagc tcgtgctaata 120
gaattgggtg ttggagtaac aattgctatt atgaaagctg atcaagtatt gcaaatgagc 180
taccatatgc caaatgctaa tttagtaagt tgtacttttag ctctataaaaa ggcatgggtca 240
gcattagcaa tgaagggaacc taccaaggat attagtaagg atatccaacc aggtgccgga 300
ttatatcaaa tggaaacaat gcttgatggt aagttagcat cttttgcagg tggttattcca 360
ttgaagatta acgatgaaat tattggagcg attgggtgta gtgggtggatt ggttgaagaa 420
gatcaatcaa tttgtgaagc tgctgttgca gaatttttga aggagagtaa gtag 474

<210> 66
<211> 348
<212> DNA
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 66
atggctagggc aggatatcaa acggacaatt caagaatatg ttccgggtaa acaggtaaca 60
ttagcacata tcgttgctaa ccctacgcca gacatttatg agaaattagg gatacaaaact 120
cctaaaaaatg cgcttggtat tttgacaata acgccaaagt aagcctcaat tatcgctggg 180
gatattgcta caaagtcgag taatgttact ctaggggttca ttgatcgatt tagtggctcg 240
gttgtaattg tgggagaagt ttctgaaatt gaatcagctt tgcgcatgt ggttgataag 300
ctacaaacgt tactgggggt tgatgttcct gaaattacac gaacataa 348

<210> 67
<211> 795
<212> DNA
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 67
atggcgaatc atcagcgaat tctagcgttt gaaaatggat ttaattttcg agatcttggt 60
ggttatagaa ctattgatgg cgaaagtctg aaatggaata atcttggttcg ttctgcgcat 120

ctctcctatt ttacacataa tgagcaaaga aaactttatg gatatggtat taggacaatt	180
attgactttc gttcaacttc cgaagtagct ttttatcccg accaattaac atcattgatg	240
aattatattc ggataccggg ctttgagaat gaccttactg aaagtaatat tagtattgct	300
gaagcacgaa aaagtttttc aaaggatcca caagcgggtt ttaatcgcat gatggaagta	360
tattgtcaat ttgtcactga tgagaaagca caagaagcat ttcacacctt tattaaaaaa	420
ttatgcctac attcagcgca gggtggtggt ttatttcatt gctctgcggg gaaagaccgt	480
actggtttag gagcaattta tttactaagt cttctacaag ttccagtaga tataatttat	540
caagattata ttttaactaa taaagcatca aaaaaagga taaaagaacg attacgttat	600
gctataaaaa ataacctagg tgataattat cttcaactca tttacgatct ttcaacagca	660
aatagggtgtt attatgatca agcaatctct cttattaata ataaatatgg tggaatgacc	720
tcttacttaa aagatgtgtt acaaatcagt gattcaatgg ttgaacaact aagatactta	780
tatctgacaa agtga	795

<210> 68
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 68	
atgtattttg atgttgaaac gaatgacgtg cgaccacatt caattttgat aaatcaaggc	60
gaaaactttg aacatgctcg tgcacgaata tggtcatttt tattggatac ttcttataag	120
tateccacaac aaaatathtt aataattaca catggctgga taataaaaaa tatcatttcg	180
ttgtgtcttg agaatatatga tgggacttca ttcaaaaatc ccaataatct aagtattagt	240
aagatccaat tgaatccggc attaaagcag caacgaatat gttattataa tcgaccgttc	300
atagggacga tgatattatg a	321

<210> 69
 <211> 558
 <212> DNA
 <213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 69

atgagtcctta ttacaattct tttgatatatt gtgggactta atattgatac gtttattgca	60
ctattattttc ttttacgaaa ctataattac cggttaccga ttattggcctt tggagtagca	120
acgccttattt tatggatcct tggggtaatt ttaggaaaag ggctagcatt tctattttcca	180
gattggatta caggatttat gggcattatt ttaatcttta tagcgctttt tgaacaggat	240
gacgaaaaaa agacaactaa tacaagtttt ctctcattac ttctgttttg tttaaagcctt	300
ggtaggagata atcttgctgt ttatatattcca ttggtaggta accttagttg gagtcagatt	360
atatacgtag gaataatttt tgaaatttgt tcagtcctat taattctatt aggaaaacaa	420
tttgtttttaa taaaacctgt ggcatatttg ttggaaaaat atggtaattt tggaaagcaaa	480
attgtttatg ttttagcggg tttatatatt atttggaata gtcatttaat taatcacctt	540
attagaattt ttaattaa	558

<210> 70
 <211> 429
 <212> DNA
 <213> *Lactobacillus reuteri*

atgaaacgaa ctatgtttat cggagcaata gcatgtggta aaacaaccct tactcaacga	60
ttagaaaatc aacaaattaa atataataaa acacaagcaa ttgaattttc atcaaataatt	120
attgacacac caggagaata tatggagcat cataatatga tgagcacggt acgtgtaacc	180
tcgatggatg ctgatatagt tgttttatta caaagtgcgg ttgacaaacg acttgttttc	240
cgggctggct tctgttcaat gttttcgaaa cctactttag gtgtagttac aaagattgat	300
cttgtaaaaag accctgccga cattgaatat tccaagaatc ttctgttaag cgctggggta	360
aagaaggtaa ttcctgtttc ggcagttgaa aatatatta tcgataaatt agttgctgaa	420
cttaattaa	429

<210> 71
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 71

atggaccgca ttattcaate accggggtaaa tacateccagg gcgctgatgt gattaatcgt 60
taacc 65

<210> 72

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 72

ctgggcggaat acctgaagcc gctgggcagaa cgctgggttag tgggtgggtga caaatcttg 58

<210> 73

<211> 1257

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 73

atggaccgca ttattcaate accggggtaaa tacateccagg gcgctgatgt gattaatcgt 60
taaccatgtt caaaacgacg ctctgcgcct tattaattac cgectcttgc tccacatttg 120
ctgccccctca acaaatcaac gatattgtgc atcgcacaaat taccgccctt atagagcaac 180
aaaagatccc gggatatggcg gtggcggttaa ttatcagggt taaaccttat tactttacct 240
ggggctatgc ggacatcgcc aaaaagcagc ccgtcacaca gcaaacgttg tttgagttag 300
gttcggtcag caaaacattt actggcgtgc ttgggtggcga cgctattgct cgaggggaaa 360
tcaagttaag cgatcccaca aaaaaatact ggccctgaact taccgctaaa cagtggaatg 420
ggatcacact attacatctc gcaacctaca ctgctggcgg cctgccattg cagggtgccgg 480
atgagggtgaa atcctcaagc gacttgctgc gcttctatca aaactggcag cctgcatggg 540
ctccagggaac acaacgtctg tatgccaaact ccagtatcgg ttgttcggc gcactggctg 600
tgaagccgtc tggtttgagt tttagcagg cgatgcaaac tcgtgtcttc cagccactca 660

a a c t c a a c c a t a c g t g g a t t a a t g t a c c g c c c g c a g a a g a a a a g a a t t a c g c c t g g g g a t	720
a t e g c g a a g g t a a g g c a g t g c a t g t t t e g c c t g g g g c g t t a g a t g c t g a a g e t t a t g g t g	780
t g a a g t c g a c c a t t g a a g a t a t g g c c c g c t g g g t g c a a a g c a a t t t a a a a c c c c t t g a t a	840
t c a a t g a g a a a a c g c t t c a a c a a g g g a t a c a a c t g g c a c a a t e t c g c t a c t g g c a a a c c g	900
g c g a t a t g t a t c a g g g c c t g g g c t g g g a a a t g c t g g a c t g g c c g g t a a a t c c t g a c a g c a	960
t c a t t a a c g g c a g t g a c a a t a a a a t t g c a c t g g c a g c a c g c c c c g t a a a a g c g a t t a c g c	1020
c c c c a a c t c c t g c a g t a c g c g c a t c a t g g g t a c a t a a a a c a g g g g c g a c c g g c g g a t t t g	1080
g t a g c t a t g t c g c g t t t a t t c c a g a a a a a g a g c t g g g t a t c g t g a t g c t g g c a a a c a a a a	1140
a c t a t c c c a a t c c a g c g a g a g t c g a c g c c g c c t g g c a g a t t c t t a a c g c t c t a c a g t a a c	1200
t g g g c g a a t a c c t g a a g c c g c t g g c a g a a c g c t g g t t a g t g g t g g g t g a c a a a t t t g	1257

<210> 74
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial

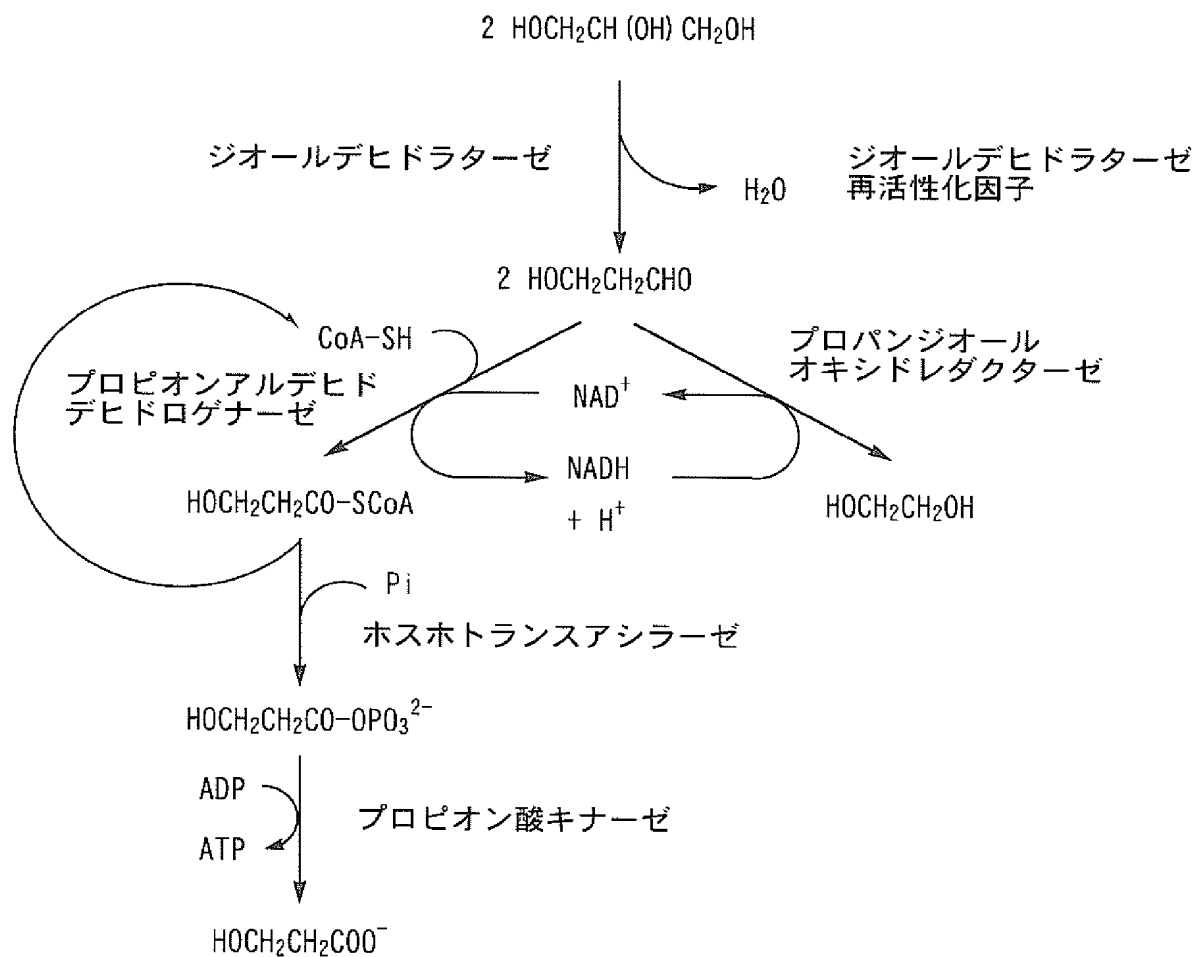
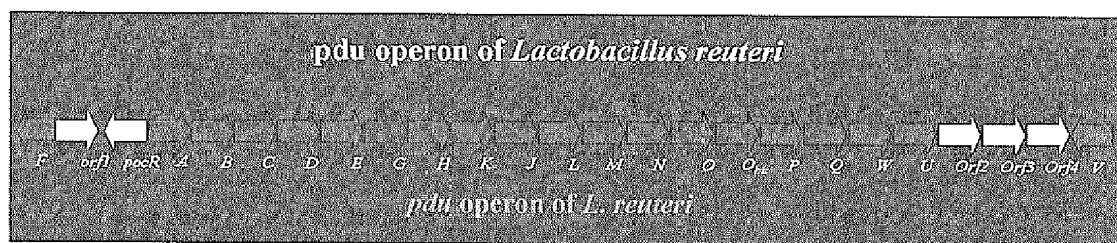
<220>
 <223> synthetic DNA

<400> 74	
g g a a t t t a g g t t t t t c g c a a a c c a g c t a t t t t t g c a a a g t g t t t c g c c a g	50

<210> 75
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA

<400> 75	
a t c g a t a c c c c c g g g g a a t a t c t g g a a a a c c g c t g c c t g t a c a g t g c a c t	50



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、グリセロールから1,3-プロパンジオールを製造する際の効率性を改善し、工業上有用なプロセスを提供することを目的とする。

【解決手段】 *Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Listeria*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Escherichia*属細菌、*Enterobacter*属細菌、*Caloramator*属細菌、*Acetobacterium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Flavobacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Citrobacter*属細菌及び*Propionibacterium*属細菌から選択される細菌において、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がロックアウトされたロックアウト細菌。

【選択図】 なし

出願人履歴

0 0 0 0 0 4 6 2 8

20001206

住所変更

5 9 3 1 4 6 9 6 9

大阪府大阪府中央区高麗橋4丁目1番1号

株式会社日本触媒